

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR L'HÉMOLYSINE STREPTOCOCCIQUE

par E. CÉSARI, L. COTONI et J. LAVALLE.

L'hémolyse produite par les streptocoques a donné lieu à des recherches très nombreuses, mais, aujourd'hui encore, elle est loin d'être complètement connue et expliquée. La diversité des opinions est due aux différentes techniques employées, au pouvoir hémolytique variable des échantillons de streptocoques, à la durée souvent éphémère du pouvoir hémolytique d'une même culture, enfin à la fragilité de l'hémolysine streptococcique. L'étude de l'hémolyse produite par les streptocoques est cependant, à divers titres, d'un grand intérêt. Le pouvoir hémolytique est un caractère employé couramment comme moyen de différenciation des streptocoques entre eux et avec les autres espèces microbiennes (Schottmüller). On a soutenu qu'il existait une relation constante entre le pouvoir hémolytique d'un échantillon de streptocoque, son activité pathogène chez les animaux d'expérience et encore la gravité des infections streptococciques humaines. Enfin il est intéressant de comparer l'hémolysine streptococcique aux hémolysines des autres bactéries.

Knorr (1) [1893] semble être le premier auteur décrivant des altérations d'origine hémolytique chez les lapins inoculés dans le péritoine ou sous la peau avec certaines cultures de streptocoques; il signale l'infiltration séro-sanguinolente du tissu conjonctif sous-cutané, les épanchements séro-hématiques de la plèvre, du péritoine et du péricarde, l'aspect liquide et laqué du sang du cœur.

Marmorek (2) a mentionné brièvement ces lésions dès 1895, Bordet (3) [1897], von Lingelsheim (1899) les ont également décrites. Lubenau (4) [1901] a appliqué à l'étude de l'hémolyse streptococcique la technique de Neisser et Wechsberg. Besredka (5) [1901], travaillant avec le streptocoque de Marmorek, a fixé certaines conditions expérimentales qui permettent d'obtenir une hémolysine active. Il a constaté la filtrabilité de l'hémolysine dans les cultures en sérum de lapin diluées d'eau physiologique, sa propriété de dissoudre les hématies de plusieurs espèces animales, sa sensibilité à la chaleur, ses variations suivant l'espèce animale qui fournit le sérum utilisé comme milieu de culture, enfin l'impossibilité d'obtenir une antistreptolysine chez les animaux.

Comme le note Berdnikoff (6) dans un article très documenté, les recherches portant sur l'hémolysine streptococcique s'orientent à partir de 1901 dans deux directions principales. Les uns, comme Bordet, Besredka, étudient les conditions de production de l'hémolysine et les rapports de la fonction hémolytique avec la fonction toxigène, l'immunité, la gravité des infections streptococciques. Les autres utilisent le caractère hémolytique pour classer les streptocoques (7) [von Lingelsheim (1899), Marmorek (1902), Schotlmüller (1903)]. Ces deux courants n'englobent pas d'ailleurs tous les travaux publiés sur l'hémolysine streptococcique. D'autres recherches tendent à élucider le mécanisme de l'hémolyse et pénétrer la nature de l'hémolysine.

1. *Z. f. Hyg.*, **13**, 1893, p. 427.

2. *Ces Annales*, **9**, 1895, p. 593.

3. *Ces Annales*, **11**, 1897, p. 177.

4. *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, 1. Abt., **30**, 356, 402.

5. *Ces Annales*, **15**, 1901, p. 880.

6. *Arch. des Sc. biol.*, publiées par l'Inst. Impérial de Méd. exp. à Saint-Petersbourg, **15**, nos 3 et 4.

7. *Ces Annales*, **16**, 1902, p. 172.

L'hémolysine *in vitro*.

MISE EN ÉVIDENCE ET TITRAGE.

Diverses techniques ont été proposées pour la mise en évidence de l'hémolysine streptococcique dans les milieux de culture.

1° MILIEUX SOLIDES. — Marmorek a, le premier, appliqué à l'étude de l'hémolysine streptococcique la technique des cultures sur gélose au sang créée par Pfeiffer. Les auteurs qui emploient cette technique mélangent le sang à la gélose sans spécifier toujours les proportions des composants de leur milieu. Schottmüller (1899) note que les résultats obtenus varient suivant la proportion du sang par rapport à la gélose et adopte le taux invariable de 2 parties de sang défibriné pour 5 de gélose. Si la quantité de sang est trop faible, le milieu est peu modifié et l'on n'observe pas d'anneau hémolytique autour des colonies streptococciques; si la proportion du sang est trop forte, le pouvoir bactéricide du sérum peut entraver le développement des germes. Rieke, Boxer ont confirmé l'exactitude de ces remarques. Freymuth attire aussi l'attention des bactériologues sur la nécessité de suivre une technique précise pour obtenir des résultats constants. Enfin Smith et Brown (1) [1915] ont préconisé l'emploi d'une gélose au sang ainsi composée. Leur milieu contient par litre 500 grammes de viande de veau, 5 grammes de sel, 15 grammes de gélose, 10 grammes de peptone Witte; sa réaction finale est de 0,8 à 1,2 p. 100 d'acide normal avec la phénolphthaléine prise comme indicateur. La gélose est répartie à raison de 12 cent. cubes par tube. On la fait fondre au bain-marie à 45° pendant un quart d'heure, on ajoute à chaque tube 2/3 de cent. cube de sang défibriné de cheval et on mélange intimement. Chaque tube estensemencé avec 1 ou 2 anses de culture en bouillon convenablement diluée et le contenu du tube est versé dans une boîte de Petri de

1. *Journ. med. Research*, **31**, 1915, 455.

9 centimètres de diamètre. Le milieu contenant 5 p. 100 de sang forme une couche épaisse de 2 millimètres. Après solidification, on renverse, pendant un quart d'heure à une demi-heure, la boîte qui le contient.

Brown (1) [1919] consacre un travail important à l'emploi de cette gélose au sang dans l'étude des streptocoques. Faisant varier les constituants du milieu, il obtient des colonies d'aspects différents et montre l'importance respective de divers facteurs : proportions du sang et de l'agar, origine et âge du sang, réaction du milieu, espèce animale fournisseuse de viande et marque commerciale de la peptone, présence ou absence de glucose, aérobie ou anaérobie. Il arrive à distinguer sur ce milieu l'aspect des colonies, par des types différents de streptocoques, hémolytiques (α et β) ou non (γ). Le travail de Brown représente un progrès sérieux dans l'emploi de la gélose au sang, mais la négligence d'un point de cette technique minutieuse expose à des erreurs.

D'une façon générale, l'emploi de la gélose au sang, s'il a pour résultat la différenciation de variétés de streptocoques, convient mal à l'étude de l'hémolysine, puisqu'on est dans l'impossibilité d'isoler cette dernière et à plus forte raison de la titrer. Les méthodes de titrage du pouvoir hémolytique sont bien fragiles qui reposent sur la mesure du diamètre de l'auréole entourant la colonie. Aussi aurons-nous spécialement en vue les milieux liquides.

2° MILIEUX LIQUIDES. — Ici, deux sortes de techniques, suivant qu'on ajoute le sang au *milieu stérile* ou à la *culture déjà développée*.

On peut constater l'hémolyse en ensemencant le streptocoque dans du bouillon alcalin, additionné de sang. Lingelsheim (1899) note le premier l'hémolyse du streptocoque dans les milieux liquides, en ensemencant le sang d'un animal infecté dans du sang citraté de même espèce, et voit se produire l'hémolyse après un séjour de trois à quatre heures à l'étuve. Il observe également l'hémolyse en ajoutant au sang une égale quantité de bouillon. Avec un échantillon de streptocoque

1. *Monog. of the Rockefeller Inst. for med. Research*, n° 9, 1919.

franchement hémolytique, on voit déjà au bout de quelques heures monter du dépôt des hématies une colonne rouge vin de Bourgogne. Si on laisse à l'étuve en agitant de temps à autre, toute l'hémoglobine a passé dans le liquide après vingt-quatre heures. Ensuite la coloration vire au rouge brun, par formation de méthémoglobine. Des techniques plus ou moins voisines ont été employées par divers auteurs, tels que Marmorek (1902) Schottmüller (1903), Silberstrom, Andrewes et Horder, Baumann (1906), Rieke, Zangemeister (1909). Pour éliminer l'action du sérum sanguin, Kerner (1905) ajoute au milieu liquide du sang défibriné ou des hématies lavées de lapin, abandonne trois ou quatre jours sans secouer, puis mesure le degré de l'hémolyse par la hauteur à laquelle l'hémoglobine dissoute s'élève dans le milieu limpide. Freymuth (1907), après de nombreuses recherches sur l'hémolyse en divers milieux liquides, conclut qu'elle peut se produire dans des milieux stériles, aussi refuse-t-il toute valeur à la méthode. On peut d'ailleurs reprocher à tous ces procédés la difficulté d'ajouter au milieu du sang qui soit sûrement stérile et l'impossibilité de titrer le pouvoir hémolytique. Aussi sont-ils abandonnés en général.

Dans les autres procédés utilisés également pour le titrage de l'hémolysine, on ajoute le sang à la *culture déjà développée*. Besredka (1901) emploie comme milieu du sérum de lapin, sérum chauffé une demi-heure à 55°; ensemencant avec I à II gouttes de sang laqué d'un lapin qui vient de succomber, il filtre, sur bougie Chamberland, la culture à 37° âgée de dix-huit heures, diluée au demi dans l'eau physiologique; XXIV gouttes de ce filtrat dissolvent en deux heures à 37° I goutte de sang défibriné de lapin. Schlesinger (1904) sème le streptocoque dans du bouillon, ajoute après quelques jours I goutte de sang défibriné de lapin à 5 cent. cubes de culture, laisse deux heures à 37°, puis une nuit à la glacière. Braun (1912) cultive le streptocoque dans du bouillon additionné au 1/10^e de sérum de lapin, sérum préalablement chauffé une demi-heure à 60°. Après huit à dix heures, il filtre sur filtre Reichel ou Chamberland. Pour titrer le pouvoir hémolytique, il mélange 1/2 cent. cube d'une émulsion à 5 p. 100. d'hématies de lapin avec 1 c. c. 5 de filtrat dilué. Mac

Leod (1) [1912] cultive le streptocoque dans du bouillon franchement alcalin au tournesol, additionné de 15 à 20 p. 100 de sérum équin chauffé une heure à 56°; il emploie 1 cent. cube d'une émulsion de globules de bœuf à 5 p. 100 et laisse en contact le mélange deux heures à 37°. Le pouvoir hémolytique d'un échantillon est mesuré par la dose hémolytique minimum (M. H. D.), c'est-à-dire par la plus faible quantité de culture qui hémolyse complètement en deux heures 1 cent. cube de l'émulsion globulaire. Von Hellens (2) emploie du bouillon classique faiblement alcalin au tournesol additionné de 40 à 50 p. 100 de sérum équin chauffé trente minutes à 56°. Pour le titrage du pouvoir hémolytique, 8 cent. cubes d'émulsion à 1-2 p. 100 d'hématies lavées de cheval sont mélangés à 2 cent. cubes de culture ou de filtrat à des dilutions variées: on observe l'hémolyse après séjour à 37° pendant deux heures et à la glacière pendant une nuit. North, White et Avery (1914), Lyall (3) [1914] avec des cultures, De Kruif et Ireland (4) [1920] avec des filtrats, utilisent des techniques très voisines de la précédente.

Dans la plupart des publications, les auteurs conseillent de laisser cultures ou filtrats deux heures en contact avec les hématies. On peut se demander si ce séjour prolongé à l'étuve ne permet pas le développement des cultures, d'où une cause d'erreur, aussi préférons-nous utiliser la technique suivante:

On emploie comme milieu de culture du bouillon Martin additionné de 1/10 de sérum équin non chauffé, stérilisé par filtration sur bougie Chamberland. On ensemence en partant d'une culture dans le même milieu et on utilise la culture totale développée à 37°. L'expérience nous a montré que les cultures âgées de sept à huit heures sont préférables le plus souvent, pas toujours cependant, comme on le verra plus loin. On se sert pour la recherche de l'hémolyse des hématies de mouton lavées deux fois et émulsionnées dans l'eau physiologique, au taux de 10 p. 100. Des quantités décroissantes de culture sont mélangées à une quantité fixe (1 cent. cube) d'émulsion globulaire. On complète à 2 cent. cubes avec du milieu de culture stérile. On place les tubes au bain-marie à 35° et on fait la lecture au bout d'une heure.

(1) *Journ. Path. and Bact.*, **16**, 1911-1912, p. 321 et *Ibid.*, **19**, 1914-1915, p. 392.

(2) *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, **68**, 1913, p. 602.

(3) *Journ. med. Research*, **30**, 1914, p. 488.

(4) *Journ. of inf. Dis.*, **26**, 1920, p. 285.

NUMÉROS DES TUBES	NOMBRE de gouttes de culture	NOMBRE de gouttes de bouillon-sérum neuf	ÉMULSION à 10 p. 100 d'hématies de mouton, dans l'eau physiologique (en cent. cubes)
1	XX	0	1
2	XV	V	1
3	X	X	1
4	VIII	XII	1
5	VI	XIV	1
6	IV	XVI	1
7	II	XVIII	1
8	I	XIX	1

Il nous a paru avantageux de limiter à une heure le temps de contact, pour éviter une multiplication secondaire des cultures. Les cultures totales sont préférables aux filtrats, la filtration étant capable d'affaiblir le titre hémolytique dans une mesure impossible à prévoir. Enfin on aura soin de placer les tubes d'expérience au bain-marie pour les porter rapidement à la température de 35°.

Nos recherches ont été effectuées avec 40 échantillons de streptocoque d'origine pathologique. La plupart nous ont été remis par nos amis Truche et Lévy-Bruhl, que nous sommes heureux de remercier ici de leur obligeance. Parmi ces 40 échantillons, 22 ont été isolés chez l'homme au cours d'affections diverses (otite compliquant ou non la scarlatine, mastoïdite, méningite, angine, endocardite maligne, infection puerpérale, broncho-pneumonie, anasarque, pleurésie, pyélonéphrite, abcès, etc.), 15 autres ont été prélevés dans la moelle osseuse, à l'autopsie d'oiseaux, poules le plus souvent, ayant succombé à des affections diverses. Un échantillon provient d'une infection streptococcique spontanée de lapin et deux autres ont été trouvés à l'autopsie de cobayes inoculés avec du virus aphteux. Sur ces 40 échantillons, 28 se montrent hémolytiques pour les hématies de mouton, 12 n'ont pas fourni d'hémolysine même dans les conditions reconnues les plus favorables à la production de cette dernière. Notons que streptocoques humains et aviaires peuvent les uns et les autres se montrer hémolytiques ou non. Remarquons encore que les germes franchement virulents pour la souris et le lapin ont

été rencontrés exclusivement dans le groupe aviaire. Ce dernier est loin d'ailleurs de ne compter que des échantillons pathogènes, mais seulement 5 sur 15. Nous reviendrons à la fin de ce travail sur les relations qui existent entre le pouvoir hémolytique et la virulence des streptocoques. Les données précédentes ressortent de l'examen du tableau figurant plus bas.

Nous n'avons retenu dans notre étude que les échantillons pour lesquels s'imposait, sans hésitation possible, le diagnostic de streptocoques. Il s'agissait de cocci colorés par la méthode de Gram, poussant agglutinés plus ou moins énergiquement dans le bouillon Martin, se disposant dans ce milieu en chaînettes de longueur variable, insolubles dans les sels biliaires. C'est avec intention que nous citons d'abord les caractères *nécessaires*. Quant aux autres, rencontrés dans l'étude de ces échantillons, il n'en est pas de constant, au sens strict du mot. La plupart de nos échantillons fournissent sur la gélose Martin, glucosée à 2 p. 1.000 ou sur la gélose au milieu T (1), des colonies petites, régulièrement arrondies, incolores, transparentes, devenant ensuite plus ou moins volumineuses et présentant une surface plissée, un bouton central et des bords dentelés. A signaler que dans les cultures sur milieux solides les chaînettes sont exceptionnelles. On observe de préférence des cocci ronds ou ovales, isolés ou groupés en diplocoques et en amas. Rappelons encore qu'on peut, dans des cultures sur milieux solides, même âgées de moins de vingt-quatre heures, rencontrer des formes bacillaires ou en massues, qui feraient douter de la pureté de la culture un observateur non averti. Ces formes ont été vues par plusieurs auteurs. Kermorgant (2) les a récemment décrites. Dans les cas douteux on recourt avec avantage à l'examen microscopique des milieux liquides : en prélevant, sans agiter les tubes dans le dépôt microbien, on trouve les chaînettes plus caractéristiques. Tous les échantillons que nous avons observés croissent à 40° aussi bien qu'à 37°. A 22°, certains échantillons ne poussent pas dans la gélatine. Tous coagulent le lait à 37°, presque toujours rapidement en dix-huit à trente-six heures, et se développent abondamment

(1) Ces *Annales*, 1911, p. 480.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, 87, 1922, p. 642.

dans l'eau peptonisée lactosée à 1 p. 100 sans dégager de gaz. Un caractère important très répandu parmi les streptocoques est leur grande résistance à l'autolyse.

CONDITIONS DE PRODUCTION DE L'HÉMOLYSINE.

Passons brièvement sur les *milieux solides*, qui se prêtent assez difficilement à des expériences sur l'hémolysine. Les corps microbiens récoltés sur *gélose-ascite* ou *gélose-sérum* émulsionnés en bouillon-sérum se montrent dénués de pouvoir hémolytique. Sans doute l'hémolysine diffuse au sein du milieu, puisque les colonies sur gélose au sang s'entourent d'une aïre claire. D'ailleurs cette hémolysine doit être moins abondante que dans les milieux liquides, le développement microbien des streptocoques se montrant relativement maigre sur milieux solides. Quant à la *gélose au sang*, son emploi nécessite, comme le montrent les recherches détaillées de Brown, des précautions techniques minutieuses; faute de les observer, l'existence du pouvoir hémolytique risque de passer inaperçue. La production d'un anneau clair d'hémolyse plus ou moins étendu autour de la colonie streptococcique paraît liée à deux conditions: l'issue de l'hémoglobine hors des globules et sa diffusion dans l'épaisseur de la gélose. Si l'on ensemence le streptocoque sur la gélose additionnée de sang préalablement laqué et centrifugé (solution d'hémoglobine), on n'observe pas d'anneau hémolytique. Si les colonies sont trop confluentes, les anneaux manquent également, la diffusion de l'hémoglobine dans le milieu s'opérant avec peine.

Les *milieux liquides* se prêtent beaucoup mieux à l'étude de l'hémolysine. Tous les auteurs accordent la préférence aux milieux additionnés d'humeurs (sérum de diverses espèces animales, liquide d'ascite). Nous nous sommes arrêtés à l'emploi du bouillon Martin additionné de 1/10^e de sérum équin frais. La proportion optimum de sérum, l'utilité ou non de l'inactivation du sérum, l'espèce animale à laquelle il est emprunté, sont autant de points discutés. Mac Leod (1912) observe le maximum de pouvoir hémolytique dans les cultures en bouillon-sérum humain ou mieux encore équin, le sérum étant chauffé une heure à 56° et ajouté au bouillon dans la pro-

portion de 10 à 50 p. 100, mieux encore de 15 à 20 p. 100. Von Hellens (1913) utilise du bouillon additionné dans la proportion de 40 à 50 p. 100 de sérum équin chauffé une demi-heure à 56°; les résultats ont été aussi bons avec le bouillon-ascite, inférieurs avec le bouillon-sérum inactivé de lapin à 10 p. 100, médiocres avec le bouillon simple. Lyall emploie le bouillon-ascite, peptonisé à 2 p. 100. De Kruif et Ireland (1920) ont consacré une longue étude à la recherche du meilleur milieu. Ils concluent à l'adoption du bouillon additionné à 20 p. 100 de sérum équin inactivé; les sérums équin et ovin sont équivalents, le sérum équin est supérieur au sérum humain, plus encore au sérum de lapin. A la concentration de 20 p. 100, les sérums humain, équin et ovin leur paraissent également bons et le chauffage indiqué. On ne constate donc pas d'accord entre les auteurs sur la composition du milieu optimum. Les résultats des recherches minutieuses de De Kruif et Ireland ne seraient-ils valables que pour l'unique échantillon de streptocoque qu'ils ont employé? Pour notre part, nous n'avons pas, chez 3 échantillons spécialement examinés à ce point de vue, constaté de différences importantes dans le pouvoir hémolytique des cultures âgées de huit heures, qu'elles soient faites en bouillon-sérum équin tel quel ou inactivé, ajouté au bouillon dans la proportion de 10 ou de 20 p. 100.

Nous n'avons pas observé de différences dans le pouvoir hémolytique des cultures *aérobies* ou *anaérobies*, et plusieurs auteurs ont déjà fait la même remarque.

L'influence des *sucres* sur le pouvoir hémolytique des cultures est un des points les plus discutés. Nous avons durant un certain temps employé le milieu T (1), de préparation simple et rapide et constaté que beaucoup d'échantillons de streptocoque s'y montraient hémolytiques. Mais en reprenant à l'aide du bouillon-sérum équin l'étude de tous les échantillons, nous avons vu certains d'entre eux hémolyser exclusivement dans ce dernier milieu. Cette particularité était d'autant plus frappante qu'en milieu T le développement microbien est souvent plus riche. Le glucose exerce-t-il une influence nocive sur l'hémolyse? La question est depuis long-

(1) Ces *Annales*, 1911, p. 480.

temps à l'étude. E. Sachs (1) [1909] croit que les cultures en bouillon glucosé à 1 p. 100 demeurent hémolytiques moins longtemps, le streptocoque y périssant plus vite par l'acidité du milieu que produit l'attaque du glucose. Kuhn (2) [1912] suppose que le métabolisme du streptocoque est modifié radicalement en présence de sucre. Lyall (1914), examinant l'acidité et le pouvoir hémolytique, après dix-huit heures, des cultures en bouillon-ascite additionné de sucres divers à 1 p. 100 constate que le plus souvent le sucre gêne l'hémolyse; cependant tous les sucres ne seraient pas inhibiteurs pour un échantillon de streptocoque donné; le dextrose est le plus inhibiteur et ce pouvoir empêchant ne paraît pas en rapport avec le degré de l'acidité. Brown (1919) pense qu'en présence d'un sucre fermentescible, le métabolisme azoté du streptocoque est réduit au minimum, aussi la production d'hémolysine est-elle restreinte ou empêchée. D'après Stevens et Koser (3) [1919], l'hémolysine apparaît plus tard, disparaît plus tôt et se montre moins abondante dans le bouillon dextrosé à 1 p. 100 que dans le bouillon simple. En présence de sucres fermentescibles, le streptocoque utilise plus de substances hydrocarbonées et moins de protéines. L'acide développé diminue la vitalité de la culture et la protéolyse, et détruit l'hémolysine à la température de l'étuve. Cook, Mix et Culvyhouse (4) [1921] ont vu également que l'addition, au taux de 1 p. 100, de sucres fermentescibles retarde l'apparition de l'hémolysine qui est moins abondante, et hâte sa disparition. Avec des doses inférieures à 1 p. 100, il n'y a pas d'inhibition de l'hémolyse. Ces auteurs fournissent la preuve que l'inhibition n'est pas due à la simple présence du glucose, mais à son action sur la formation de l'hémolysine. L'acidité est le facteur d'inhibition le plus important, puisque la neutralisation continue des acides par addition de phosphates prolonge la durée du pouvoir hémolytique; d'autre part la neutralisation de l'acidité d'un filtrat de culture glucosée restituée au milieu la faculté de produire de l'hémolysine.

La température du développement influe également sur la

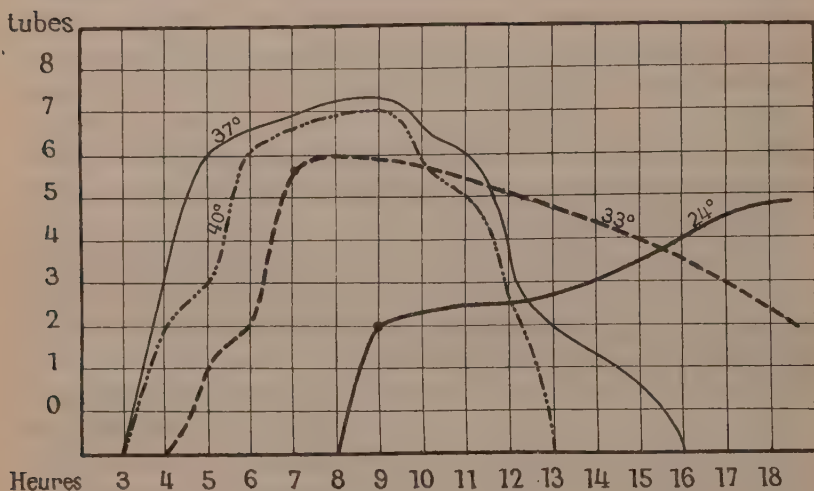
(1) *Z. f. Hyg.*, 63, 1909, p. 463.

(2) *Centrabl. f. Bakt. Orig.*, 1, 63, 1912, p. 97.

(3) *Journ. of exp. Med.*, 30, 1919, p. 539.

(4) *Journ. of inf. Dis.*, 28, 1921, p. 93.

production de l'hémolysine. Nous donnerons comme preuve les courbes figurant au tableau ci-joint. Elles expriment le pouvoir hémolytique d'un échantillon de streptocoque cultivé en milieu T aux températures respectives de 40°, 37°, 33° et 24°. C'est à 37° et à 40° qu'apparaît et disparaît le plus vite l'hémolysine. A 37°, la culture est franchement hémolytique à la quatrième heure; à la cinquième heure, le pouvoir hémolytique n'est pas éloigné de son maximum, qui est atteint vers la septième heure. Il baisse rapidement à partir de la dixième



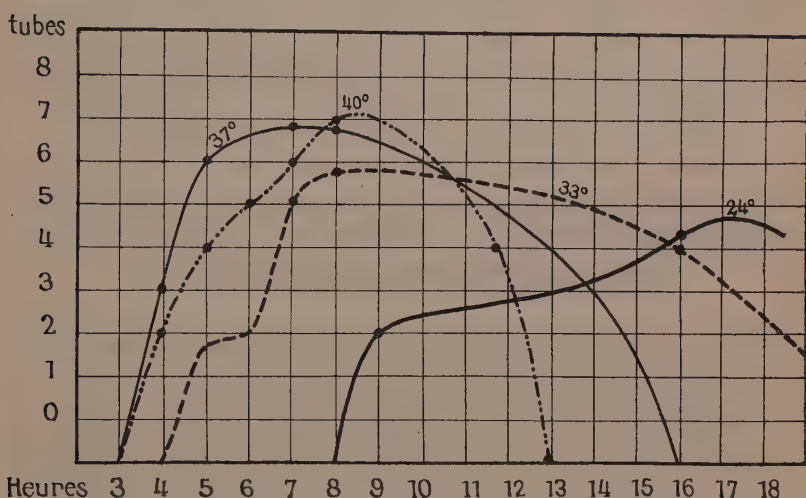
I. — Courbes des variations du pouvoir hémolytique de l'échantillon *Maurice*, à différentes températures (milieu T).

heure et a disparu vers la seizième. A 40°, disparition plus précoce encore. A 33°, le développement microbien est plus lent, le pouvoir hémolytique atteint son maximum vers la huitième heure et baisse beaucoup plus lentement qu'à 37° et à 40°; à la seizième heure la culture demeure hémolytique. A 24° où le développement est encore plus lent, la courbe se maintient plus bas.

Pour la plupart des autres échantillons que nous avons examinés, le maximum du pouvoir hémolytique s'observe à partir de la huitième heure environ, dans les cultures à 37°, mais il est important de pratiquer l'ensemencement dans des

conditions favorables, sous peine de n'obtenir à la huitième heure qu'une culture peu ou pas hémolytique. Le mieux nous paraît être d'ensemencer le streptocoque deux fois à douze heures d'intervalle et d'utiliser seulement pour l'hémolyse la troisième culture qu'on aura eu soin d'ensemencer dans le milieu préalablement chauffé à 37°.

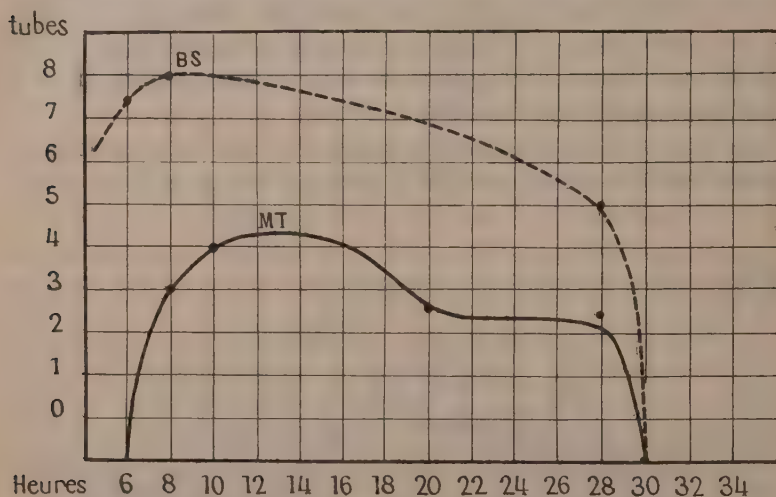
On ne rencontre dans la littérature que peu de précisions sur le moment le plus convenable à la recherche du pouvoir hémolytique dans une culture. Ce point particulier est cependant



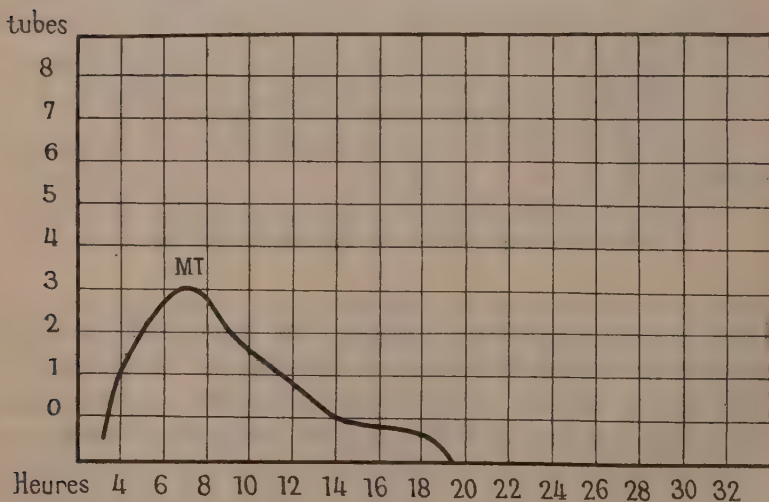
II. — Courbes des variations du pouvoir hémolytique de l'échantillon *Maurier*, à différentes températures (Bouillon Martin, sérum équin).

d'une grande importance pratique. Mac Leod (1912) parle de cultures de huit à douze heures, von Hellens (1914) décèle de l'hémolysine dans les cultures âgées d'une heure, mais observe le maximum entre sept et huit heures ; après huit-treize jours, l'hémolysine a disparu ; on en retrouve parfois dans les cultures âgées de trois à quatre semaines, il s'agit ici de cultures en bouillon additionné de sérum inactivé équin de préférence, à 40-50 p. 100. L'examen d'un certain nombre d'échantillons nous a montré, qu'en milieu T, la courbe du pouvoir hémolytique diffère suivant les échantillons examinés. Chacun des échantillons étudiés a été cultivé à 37° dans un ballon de

80 cent. cubes de milieu T et des prélèvements ont été opérés à des stades variés du développement microbien; les courbes



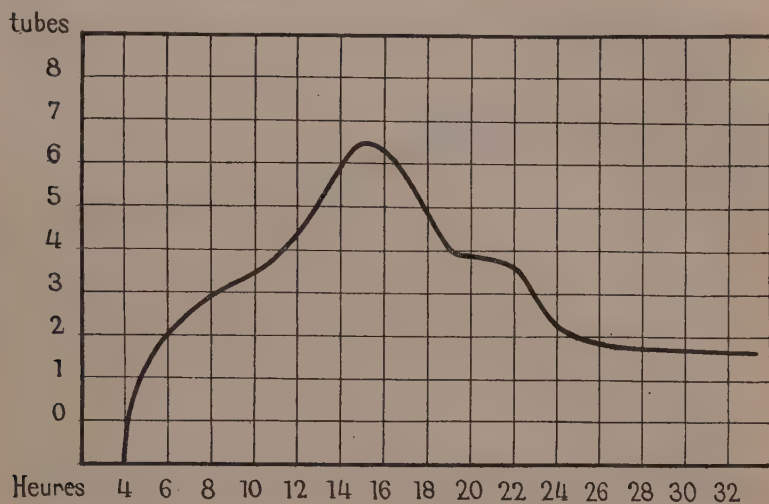
III. — Courbes du pouvoir hémolytique de l'échantillon *Bard* à 37°
(Bouillon Martin, sérum équin, BS et milieu T, MT).



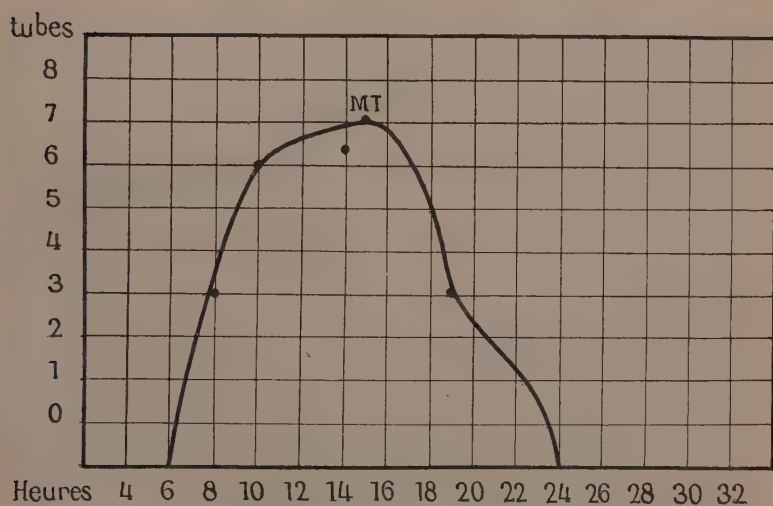
IV. — Courbe de l'échantillon *Lebigre* (milieu T-37°).

ci-jointes résument les résultats observés. A noter que sur 2 échantillons de streptocoque examinés à la fois en milieu T et en bouillon-sérum équin, les courbes de l'hémolysine

variaient peu pour l'échantillon Maurice, mais sensiblement pour l'échantillon Bard.



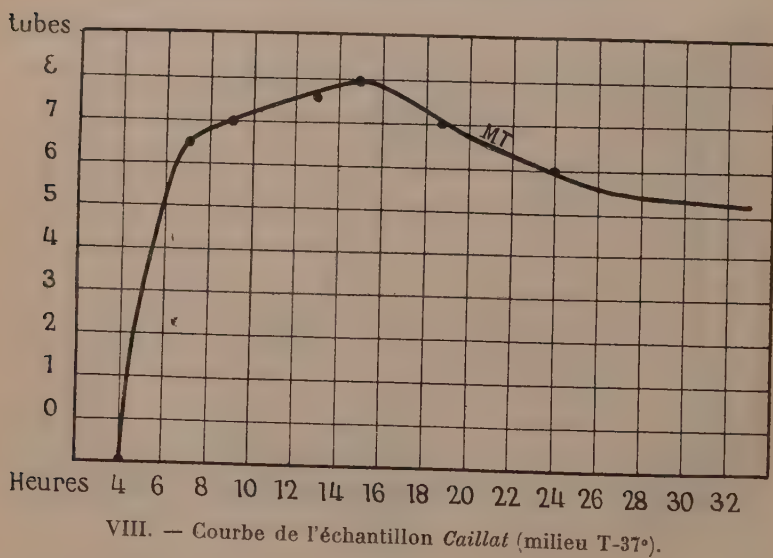
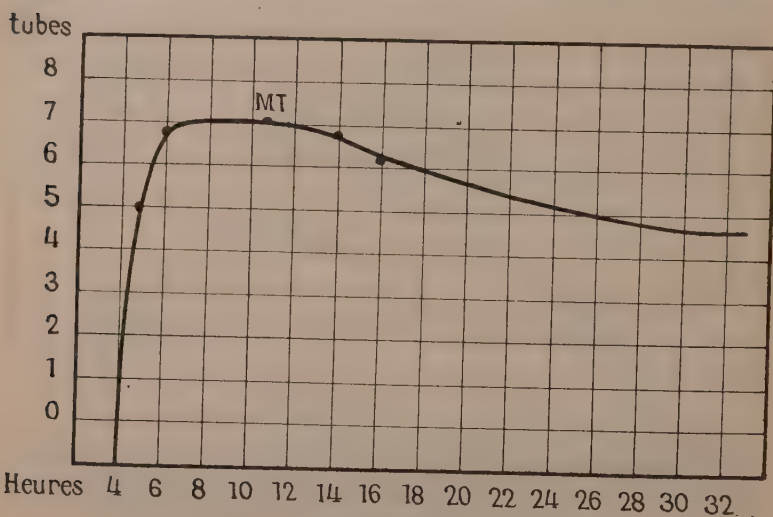
V. — Courbe de l'échantillon *Netter* (milieu T-37°).



VI. — Courbe de l'échantillon *Pion* (milieu T-37°).

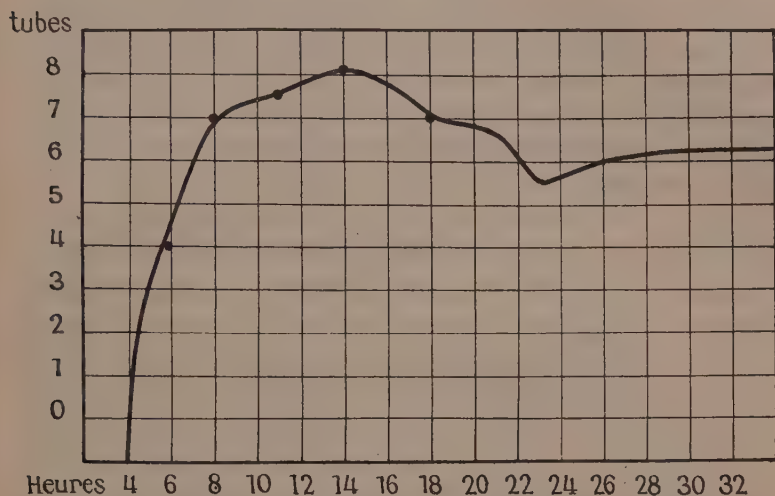
En milieu T, les échantillons Lebigre et Maurice présentent leur maximum de pouvoir hémolytique vers la septième heure, puis ce pouvoir baisse déjà à partir de la huitième heure et

disparaît entre la seizième et la dix-neuvième : ici, apparition et disparition rapides. Les échantillons Netter et Pion offrent

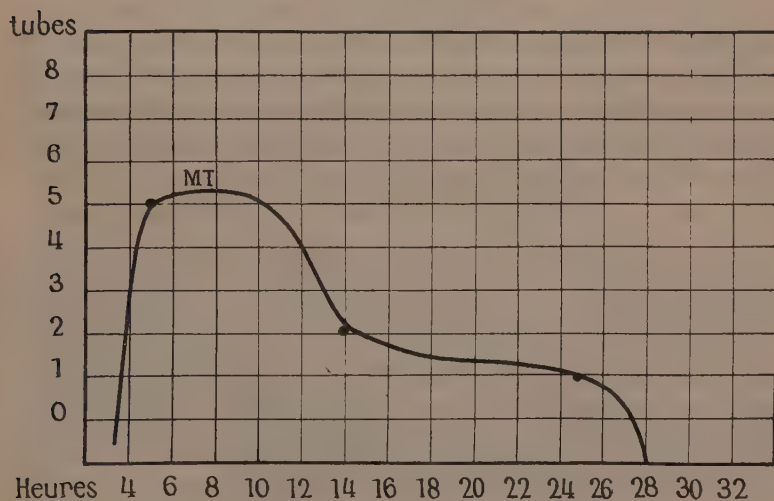


des courbes différentes des précédentes : le pouvoir hémolytique faible à la huitième heure n'atteint son maximum qu'à la quinzième, baisse entre la quinzième et la dix-neuvième et se

montre faible ou nul à la trentième : ici, apparition tardive du maximum et durée plus longue de l'hémolyse. Les échantillons



IX. — Courbe de l'échantillon *Mil* (milieu T-37°).

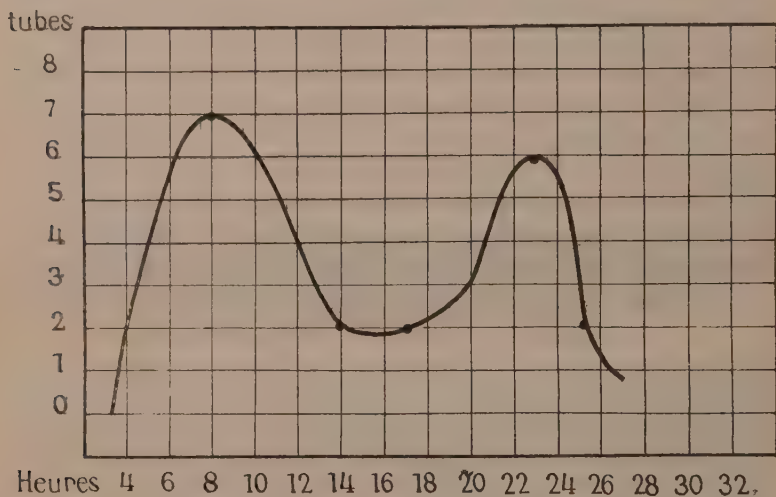


X. — Courbe de l'échantillon *Cavum* (milieu T-37°).

Vir et Caillat diffèrent encore du type précédent : le maximum apparaît dès la septième heure, mais le pouvoir hémolytique persiste aussi accentué à trente heures ; à la soixante-septième

heure, il a disparu : ici, maximum précoce, plateau, et lente disparition. La lecture des courbes montre que les autres échantillons, étudiés en milieu T, offrent autant de types divers.

Il s'agit, pour les courbes précédentes, d'échantillons de streptocoques étudiés en milieu T, c'est-à-dire glucosé à 2 p. 1.000. Une fois vérifiée la supériorité du bouillon-sérum équin pour la production de l'hémolysine, nous nous sommes définitivement arrêtés à l'emploi exclusif de ce dernier milieu.



XI. — Courbe de l'échantillon O (milieu T-37°).

Un point important à retenir en pratique est que les divers échantillons offrent leur maximum de pouvoir hémolytique à des stades divers du développement, les uns vers la huitième heure, les autres vers la quinzième; d'où nous concluons que dans l'étude d'un échantillon de streptocoque, il est indispensable de rechercher la propriété hémolytique à ces deux âges de la culture avant d'affirmer qu'elle est absente.

CARACTÈRES DE L'HÉMOLYSINE IN VITRO.

Lorsqu'on cherche à réunir ces caractères d'après les travaux des auteurs, on rencontre souvent des opinions contradictoires.

Tout d'abord, où est située l'hémolysine dans les cultures? Il

importe de spécifier quel milieu on emploie, les choses se présentant différemment avec le milieu T et le bouillon-sérum équin. Les centrifugats des cultures en milieu T, prélevés à des heures variées du développement microbien, ne se sont jamais montrés hémolytiques, tandis que les cultures totales correspondantes hémolysaient énergiquement. Le culot microbien de centrifugation d'une culture hémolytique réémulsionné dans du milieu T neuf ou ayant servi à la culture est presque aussi hémolytique que la culture totale. Fait curieux : si l'hémolysine existe à un moment donné dans le milieu T, il est impossible de l'y déceler, lorsque le liquide est séparé des corps microbiens; cultive-t-on au contraire les même échantillon *en bouillon-sérum*, les centrifugats se montrent hémolysants comme les cultures totales. Jupille (1) a signalé, autrefois, de rares échantillons hémolytiques ne cédant presque pas d'hémolysine au bouillon-sérum.

La filtrabilité de l'hémolysine a été aussi l'objet de discussions nombreuses. Besredka (1901) constate que les cultures en sérum de lapin, sérum chauffé une demi-heure à 56°, étendu d'eau physiologique à parties égales fournissent après filtration sur bougie Chamberland une hémolysine active. D'après Mac Leod, les filtrats de culture en bouillon simple sur filtre Maassen sont vingt fois moins actifs que les cultures, deux à trois fois moins actifs quand on opère avec des cultures en bouillon-sérum; les filtrats sur filtre Berkefeld sont cinq fois moins actifs que les cultures, les 5 à 10 premiers cent. cubes qui traversent la bougie étant moins hémolysants que le reste. Nos expériences personnelles nous ont montré des résultats variables suivant les filtrations; sur bougie Berkefeld, des cultures en bouillon-sérum âgées de huit heures, nettement hémolytiques, ont fourni des filtrats tantôt aussi actifs que les cultures, tantôt très affaiblis; mais lorsqu'on prend soin de laisser un certain temps en contact la bougie et le liquide avant de commencer la filtration, les premiers cent. cubes recueillis peuvent être aussi actifs que les suivants. L'hémolysine est donc filtrable.

Sa température optimum d'activité est 37° d'après Besredka;

(1) Ces *Annales*, 25, 1911, p. 918.

elle n'agit pas à 0°; la température de 26° est moins favorable que celle de 37°, l'hémolyse s'effectuant plus lentement.

L'hémolysine est *détruite par le chauffage*. Ici encore les résultats des auteurs diffèrent. D'après Besredka, dont les recherches sont faites avec les cultures en *sérum de lapin*, le pouvoir hémolytique résiste au chauffage une demi-heure à 56°, il est affaibli après une demi-heure à 65°, détruit après deux heures à 70° et dix heures à 55°. Mac Leod (1912) donne les chiffres suivants : l'hémolysine est affaiblie après chauffage de trente minutes à 49°, détruite après trente minutes à 55°, très affaiblie après deux heures et demie à 37° ou quinze heures à la température ordinaire; à la glacière, elle se conserve huit à dix heures, puis baisse; les recherches de Mac Leod sont faites en bouillon sérum équin. Von Hellens (1914) trouve des chiffres différents pour un même échantillon de streptocoque, suivant l'espèce de sérum ajouté, en proportions d'ailleurs très inégales, au bouillon de culture : il faut vingt heures à 37° pour détruire l'hémolysine dans le bouillon sérum équin (1 + 1), neuf heures dans le bouillon-sérum de lapin (1 + 9), six à sept heures dans le bouillon ascite (1 + 2) : Besredka avait noté que l'hémolysine varie quantitativement et qualitativement avec l'espèce animale fournissant le sérum employé pour la culture. Les résultats *variables* des auteurs s'expliquent peut-être par les *différents* milieux de culture et les *différentes* techniques de mise en évidence de l'hémolyse. D'après nos constatations personnelles, les germes étant cultivés à 37° dans le bouillon Martin-sérum équin, voici des temps de chauffage au bout desquels est détruite l'hémolysine d'un échantillon : dix minutes à 70°, trente minutes à 56° (1), une heure à 45°, deux heures à 37°. Elle résiste au contraire quinze minutes à 45°, trente minutes à 44°, une heure à 37°, quatre-vingt-douze heures à 4°.

L'hémolysine est détruite par la *digestion peptique*, d'après Ruediger (2), par certains *antiseptiques*, aldéhyde formique, acide phénique et d'après Lingelsheim par le chloroforme, le toluène. Nous n'avons pas réussi à confirmer les résultats de

(1) Ce chiffre a été vérifié pour deux autres échantillons.

(2) *Journ. Amer. med. Assoc.*, 41, 1903, p. 962 et *Journ. inf. Dis.*, 4, 1907, p. 277.

von Hellens qui aurait constaté la solubilité dans l'éther de l'hémolysine du bouillon-sérum, et sa résistance dix minutes à 100° dans l'extrait éthéré. Un liquide clair où l'on fait barboter de l'air pendant quelques minutes, à la température du laboratoire, ne présente pas de baisse du pouvoir hémolytique. L'hémolysine chauffée trente minutes à 58° n'est pas réactivée par l'addition d'un liquide clair actif, comme nous l'avons constaté, ni par l'addition de sérum neuf (Besredka).

De nombreux auteurs ont étudié le *pouvoir hémolytique des streptocoques vis-à-vis des hématies de diverses espèces animales*. Dans un certain nombre de recherches, on incorpore le sang à la gélose et aboutit à des résultats variables, certaines différences de pouvoir hémolytique étant constatées vis-à-vis des différents globules, mais ces différences ne paraissent pas en général très importantes. D'ailleurs il est difficile de fonder une classification solide sur l'emploi de la gélose au sang, milieu où l'aspect de l'hémolyse dépend de trop nombreux facteurs (Brown). Avec l'emploi de bouillon-sang, les auteurs ne sont pas arrivés davantage à établir des différences tranchées suivant les espèces animales; 3 échantillons de streptocoques hémolytiques pour les hématies de mouton à la septième heure du développement en bouillon-sérum ne nous ont montré aucune différence importante dans leur pouvoir hémolytique examiné vis-à-vis des hématies d'homme, de cheval, de bœuf, de porc, de lapin, de cobaye (1).

L'hémolysine *in vivo*.

Les lapins inoculés avec des cultures de streptocoques très virulents et très hémolytiques présentent des lésions tout à fait caractéristiques sur lesquelles Knorr (1893) a le premier attiré l'attention. Marmorek (1895) les mentionne brièvement; Bordet (1897) les a décrites, ainsi que Lingelsheim. Nous les

(1) BROcq-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN, dans leur monographie sur le streptocoque gourmeux (*Revue de Pathologie comparée*, 1925), signalent que l'hémolysine du streptocoque de la gourme du cheval est toujours active vis-à-vis des globules du cheval et fréquemment aussi vis-à-vis des hématies du mouton et du cobaye.

avons de nouveau observées avec des échantillons aviaires de streptocoques, dont l'un (échantillon Bonot) tuait, au moment de son isolement, le lapin sous la peau à la dose de 10^{-9} cent. cubes de culture liquide, en deux jours et demi. A l'autopsie des lapins, on note la présence de plaques rouge vif, suivant le trajet des gros vaisseaux sous-cutanés; le sang hémolysé s'observe au niveau de la plèvre, du péricarde, du péritoine, des cavités cardiaques; le foie est friable, rose saumoné, la rate et les reins d'un rouge sombre; la surface des poumons est le siège de nombreuses pétéchies. Des lésions analogues sont constatables à l'autopsie des souris, des cobayes, des poules. D'après Bordet, chez le lapin, ces altérations « apparaissent pendant l'agonie seulement (1); elles n'existent pas quand, pour une cause quelconque, l'animal meurt avec un nombre relativement restreint de streptocoques dans le sang ». Besredka, nous-mêmes, avons vu ces lésions manquer chez certains lapins, et il ne nous est jamais arrivé de les constater chez des souris sacrifiées dans des délais variés à partir de l'inoculation; nous n'avons pas davantage observé chez les lapins pendant la vie l'aspect laqué du sang. Il est donc presque certain que ces altérations se produisent seulement pendant l'agonie ou après la mort. Nous devons cependant mentionner que Breton (2) aboutit à des conclusions opposées. Le sérum de lapin inoculé présente parfois, dit-il, dès la dixième heure avant la mort un aspect laqué, hémolyse les hématies du lapin neuf et plus facilement encore ses propres hématies. Peut-être cette expérience n'est-elle pas à l'abri de toute critique; il faudrait en effet s'assurer que le sérum ne contient pas de streptocoques capables à eux seuls d'hémolyser.

A côté de ces expériences sur l'action *in vivo* de l'hémolysine produite *in vivo* se rangent d'autres expériences sur l'action *in vivo* de l'hémolysine produite *in vitro*. MacLeod et MacNee (3) [1913] injectent au lapin des filtrats de cultures de dix-huit heures en bouillon-sérum d'un échantillon de streptocoque franchement hémolytique. Les lapins se montrent d'une sensibilité très inégale à l'injection intraveineuse des filtrats,

(1) C'est nous qui soulignons.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, 55, 1903, p. 886.

(3) *Journ. of Path. and Bact.*, 17, 1913, p. 524.

aussi les auteurs cherchent-ils, avant l'expérience, à explorer la sensibilité des animaux; mélangeant sérum de lapin et filtrat hémolytique, ils constatent que les sérums de certains animaux empêchent l'hémolyse. Ils injectent dans les veines des lapins sensibles des doses de 30 cent. cubes, réparties en trois jours consécutifs et observent une hémoglobininurie très intense dans les deux heures suivant l'injection et une diminution notable du nombre des globules rouges. A l'autopsie d'un des lapins, la réaction de l'hémosidérine était positive dans la rate, le foie et les reins. Quant aux lapins moins sensibles, ils n'ont pas présenté d'hémoglobininurie, mais une simple anémie, d'intensité variable. L'injection de filtrat chauffé deux heures à 37° ne détermine aucun des symptômes précédents. A noter que la dose de filtrat qui hémolyse *in vitro* 10 à 15 cent. cubes de sang de lapin n'hémolyse plus *in vivo* qu'une quantité dix fois plus faible.

Ces expériences nous ont paru intéressantes à confirmer. Nous avons choisi l'échantillon de streptocoque Maurice, franchement hémolytique et très pathogène pour le lapin : 11 gouttes de filtrat de culture de sept heures en bouillon-sérum à 37° hémolysaient complètement en une heure, à 35°, 1 cent. cube d'émulsion globulaire de mouton diluée au 1/10° dans l'eau physiologique; le lapin et la souris succombaient en deux jours et demi et un jour et demi à l'injection sous-cutanée de 10⁻² cent. cubes de culture. La stérilité du filtrat étant vérifiée, nous avons injecté dans la veine de lapins de 2 à 3 kilogrammes (2.300 grammes en moyenne) des quantités de filtrats variant entre 30 cent. cubes et 45 cent. cubes réparties en 3 injections dans l'espace de dix jours. Sur 4 lapins, l'un est mort par hypersensibilité au sérum équin; les 3 autres ont résisté. De ces animaux, un seul a présenté de l'hémoglobininurie dans les quatre heures qui ont suivi l'injection; 3 témoins injectés avec des doses semblables de filtrat auquel un séjour d'une nuit à 37° avait fait perdre son pouvoir hémolytique, n'ont pas présenté d'hémoglobininurie. Sur 3 souris ayant reçu chacune 1/2 cent. cube de filtrat hémolytique dans une veine de la queue, une seule a présenté de l'hémoglobininurie à la deuxième et à la troisième heure après l'injection, mais a survécu.

Ces expériences paraissent donc confirmer celles de MacLeod et Mac Née sur la sensibilité inégale du lapin à l'hémolysine.

EXISTE-T-IL UNE ANTISTREPTOLYSINE ?

De nombreux auteurs ont cherché à mettre en évidence une antistreptolysine dans les humeurs des sujets traités par les cultures ou les filtrats de streptocoques hémolytiques. Une antistreptolysine naturelle existe tout d'abord dans certains sérums normaux. Besredka (1901) constate que le sérum de cheval possède un pouvoir empêchant tandis que les sérums de mouton, lapin, cobaye, chèvre, homme, n'ont aucune action. D'après Mac Leod (1912), les sérums normaux d'homme, de lapin et de cobaye seraient antihémolytiques. Von Hellens (1913) n'a pas décelé d'antistreptolysine en quantité notable dans les sérums de l'homme et de diverses espèces animales (bœuf, cheval, mouton, chèvre, chien, lapin, pigeon, cobaye, porc). Weinberg et Nasta (4) n'ont pas trouvé d'antistreptolysine chez 150 chevaux neufs. Dans nos expériences personnelles, II gouttes de filtrat de l'échantillon Maurice (culture de sept heures) hémolysent en une heure à 35° 1 cent. cube d'émulsion de 10 p. 100 d'hématies de mouton. Si l'on ajoute II gouttes de sérum normal de lapin (inactivé) à III à VIII gouttes de filtrat (le chiffre varie suivant les expériences), et si on laisse une demi-heure en contact avant l'addition des hématies, l'hémolyse n'a plus lieu.

Presque tous les auteurs qui ont cherché à produire une antistreptolysine ont échoué. Besredka (1901) a traité le lapin, le mouton ; Ruediger (1907), le lapin, la chèvre, la poule ; Mac Leod (1912) a examiné des animaux de laboratoire, des chevaux utilisés pour la préparation du sérum antistreptococcique, des malades atteints d'affections dues au streptocoque hémolytique ; von Hellens (1913) a fait des recherches sur la chèvre, le cobaye ; seul, Breton (2) [1903], au cours d'expériences critiquées d'ailleurs par Besredka (3) et Mac Leod, aurait trouvé légèrement antihémolytique le sérum de lapins traités par des sérums de même espèce provenant d'animaux infectés.

Nous avons tenté nous-mêmes à plusieurs reprises d'obtenir

(1) *C. R. Acad. Sciences*, **170**, 1920, p. 1019.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, **55**, 1903, p. 887.

(3) *Bull. Inst. Pasteur*, 1903, p. 537.

une antistreptolysine. Une première série de lapins a reçu un filtrat hémolytique provenant de cultures de sept heures à 37° de l'échantillon Maurice. Rappelons que 11 gouttes de ce filtrat dissolvent en une heure, à 35°, 1 cent. cube d'émulsion globulaire de mouton diluée au 1/10°. Les inoculations ont été faites, suivant les animaux, par voie veineuse, sous-cutanée ou musculaire. Les doses totales de filtrat administré ont varié entre 20 et 140 cent. cubes, le traitement durant un mois environ chez certains sujets. Voici le protocole résumé d'une expérience chez un lapin traité dans les veines : 28 *avril* : 10 cent. cubes ; 29 *avril* : 10 cent. cubes ; 5 *mai* : 10 cent. cubes ; 6 *mai* : 10 cent. cubes ; 13 *mai* : 20 cent. cubes ; 19 *mai* : 20 cent. cubes ; 25 *mai* : 10 cent. cubes ; saignées le 11 *mai*, après la quatrième injection et le 2 *juin*, après la septième. Plusieurs animaux de cette première série ont succombé, pendant le traitement, à des infections intercurrentes. Les sérums des autres n'ont pas montré de propriétés antihémolytiques plus accusées que les sérums de lapins normaux. Remarquons que le filtrat du même échantillon utilisé comme antigène a été employé lors de la recherche du pouvoir antihémolytique.

Même résultat négatif dans le sérum de nos lapins qui ont reçu des quantités massives de filtrats pour la production de l'hémoglobinurie décrite par Mac Leod et Mac Nee ; nos recherches sur ce point particulier ont été rapportées plus haut.

Une troisième série de lapins a été traitée par des corps microbiens de l'échantillon Maurice desséchés vingt-quatre heures à 45°. Mis à part les animaux qui ont succombé, 2 lapins ont reçu l'un dans les veines 15 centigrammes en un mois, l'autre 30 centigrammes dans les muscles pendant le même temps, sans que leurs sérums se montrent plus antihémolytiques.

Enfin dans une quatrième série, des lapins ont reçu sous la peau un mélange, à volumes égaux, de cultures liquides du même échantillon et d'une solution de ricinoléate de soude à 0,2 p. 100 dans l'eau distillée, l'inoculation étant pratiquée après un quart d'heure de contact. Ces expériences ont été relatées ailleurs (1). Les lapins avaient reçu respectivement des doses de cultures de 28 c. c. 5 en deux mois, 14 c. c. 5 en

(1) *C. R. Soc. Biol.*, 56, 1927, p. 184.

ÉCHANTILLONS (1)	ORIGINE	DEGRÉ D'HÉMOLYSE (bouillon Martin- sérum équin). Le chiffre indique le numéro du dernier tube hémolysé		DOSE MORTELLE, sous la peau, de culture liquide, exprimée en centimètres cubes ou fractions de centimètre cube	
		Culture de huit heures	Culture de seize heures	Souris	Lapin
Hémo.	Humaine (hémo-culture).	8		10 ⁻¹ au moins.	1 = survie.
Vir.	Humaine (abcès).	7	6	10 ⁻¹ au moins.	1 = survie.
O.	Humaine (otite).	7	5	1/2 au moins.	1 = survie.
Cavum.	Humaine.	7	4		1 = survie.
Darbe.	Humaine.	7			1 = survie.
Bard.	Humaine (otite).	7		10 ⁻¹ au moins.	1 = survie.
Netter.	Humaine (méningite).	6	6		10 ⁻¹ = survie.
Caillat.	Humaine.	6	6	10 ⁻¹ au moins.	1 = survie.
Lion.	Humaine (otite).	6	5		10 ⁻¹ = survie.
Mil.	Humaine (otite scarlatineuse).	6	5	10 ⁻¹ = survie.	1 = survie.
Calvez.	Humaine (angine).	6		10 ⁻¹ = survie.	10 ⁻¹ = survie.
Tallet.	Humaine (mastoidite).	6	0	10 ⁻¹ = survie.	1 = survie.
Hay.	Humaine (pleurésie).	4	0	10 ⁻¹ = survie.	1/4 = survie.
Masto.	Humaine (mastoidite).	3	2	1/2 = survie.	1 = survie.
Norbert.	Humaine (abcès).	0	4	10 ⁻¹ au moins.	1 = survie.
Mercédès.	Humaine (anasarque).	0	3	10 ⁻¹ au moins.	1 = survie.
Macé.	Humaine (fièvre puerpérale).	0	1		10 ⁻¹ = survie.
Johnes.	Humaine (broncho-pneumonie).	0	0	1/2 = survie.	1 = survie.
Widal.	Humaine (pleurésie).	0	0	1/2 = survie.	
L. L.	Humaine (endocardite).	0	0	10 ⁻¹ = survie.	1 = survie.
M.	Humaine (endocardite).	0	0	1/2 = survie.	1 = survie.
Désir.	Humaine (pyélo-néphrite).	0		10 ⁻¹ = survie.	1 = survie.
Bonot.	Aviaire (poule).	7	7	10 ⁻⁵ au moins.	10 ⁻⁴ au moins.
Maurice.	Aviaire (poule).	7	2	10 ⁻³ au moins.	10 ⁻⁵ au moins.
R. T.	Aviaire (poule).	6	3	10 ⁻¹ au moins.	1 = survie.
Petiot.	Aviaire (poule).	6	0		1 = survie.
Truche.	Aviaire (poule).	6	0		1 = survie.
Lebigre.	Aviaire (poule).	5	0	10 ⁻⁴ au moins.	10 ⁻⁴ au moins.
Goulin.	Aviaire (poule).	4	2	10 ⁻⁷ mort inconstante.	10 ⁻⁷ au moins.
Pion.	Aviaire (poule).	2	7	10 ⁻¹ au moins.	10 ⁻⁵ .
Pérot.	Aviaire (poule).	0	0		1 = survie.
Balourdet.	Aviaire (poule).	0	0	1/2 = survie.	1 = survie.
Guérin.	Aviaire (poule).	0	0	1/2 = survie.	1 = survie.
Dinde.	Aviaire (dinde).	0	0	10 ⁻¹ = survie.	1 = survie.
Guérin II.	Aviaire (poule).	0	0	10 ⁻¹ = survie.	1 = survie.
Tardif.	Aviaire (poule).	0	0	10 ⁻³ .	1 = survie.
Laroque.	Aviaire (poule).	0		1/2 = survie.	
Cotoni.	Lapin.	7	1		10 ⁻² .
Cobaye 1.	Cobaye.	7	0	10 ⁻¹ au moins.	1 = survie.
Cobaye A.	Cobaye.	6	3	10 ⁻¹ au moins.	

(1) Il n'est pas fait mention dans ce tableau de la production de méthémoglobine observée dans plusieurs échantillons, ce phénomène n'entrant pas dans le cadre de notre étude.

deux mois et demi, 35 cent. cubes en trois mois; leurs sérums ne se sont pas montrés plus antihémolytiques que des sérums normaux.

POUVOIR HÉMOLYTIQUE ET AUTRES PROPRIÉTÉS DES STREPTOCOQUES.

On peut se demander quelle est la *fréquence du pouvoir hémolytique* parmi les streptocoques. Ceux-ci sont vraisemblablement plus souvent hémolytiques qu'on ne pense. Nous rappellerons à l'appui de cette remarque combien sont nombreuses les causes d'erreur inhérentes à la recherche du pouvoir hémolytique. Elles résident d'abord dans l'emploi de la gélose au sang, milieu fréquemment adopté; d'autre part l'utilisation non moins répandue des milieux glucosés, surtout fortement glucosés (à 1 p. 100, par exemple), peut également masquer l'existence du pouvoir hémolytique, enfin certains échantillons de streptocoques ne fournissent, nous l'avons vu, d'hémolysine que durant un stade éphémère de leur développement. Aussi, avant d'affirmer l'absence de tout pouvoir hémolytique, s'impose un examen minutieux de cultures en bouillon-sérum d'âges variés. Sur 40 échantillons de streptocoques, étudiés par nous, de *provenance humaine ou aviaire*, 11 seulement se sont montrés dépourvus de tout pouvoir hémolytique vis-à-vis des hématies de mouton.

La lecture du tableau qui précède montre l'*inégalité de ce pouvoir hémolytique chez les divers échantillons tant aviaires qu'humains*.

Que devient le pouvoir hémolytique des échantillons de streptocoque conservés in vitro? Nous n'avons jamais observé chez de nombreux échantillons de streptocoque isolés depuis plusieurs mois, parfois plusieurs années et conservés à la glacière en ampoules de bouillon-sérum équin, de baisse notable du pouvoir hémolytique, quand ce dernier était recherché dans des cultures en bouillon-sérum, suivant la technique appropriée. Schottmüller, Jupille ont également insisté sur la stabilité⁴⁶ du pouvoir hémolytique chez des échantillons isolés depuis long temps de l'organisme. Il est juste d'ajouter que d'autres auteurs ont soutenu une opinion opposée. Ce qui disparaît de préférence au pouvoir hémolytique, c'est le pouvoir pathogène pour

les animaux. Il est fréquent de voir des échantillons ayant tué le lapin sous la peau à très faibles doses de 10^{-5} cent. cubes par exemple, lors de l'isolement au sortir de l'organisme, ne tuer plus qu'à la dose de 1 cent. cube, *mais conserver intact leur pouvoir hémolytique*.

Une autre question très discutée est celle des rapports du *pouvoir hémolytique* avec ce qu'on appelle la « *virulence* » des maladies dont proviennent les streptocoques. A cette question les auteurs apportent les réponses les plus diverses, parfois absolument contraires. C'est qu'en réalité ce problème est posé de façon obscure. On s'entend assez bien sur le pouvoir hémolytique des streptocoques, bien qu'il soit estimé à l'aide de techniques diverses, mais une même technique peut permettre d'établir des degrés correspondant aux différents échantillons. Tandis qu'on prête au terme de « *virulence des maladies* » des sens divers. Tout d'abord on ne peut parler, est-il besoin de le dire, que d'infections de gravité variée, la virulence étant une propriété réservée aux agents pathogènes. D'ailleurs cette virulence elle-même ne nous est connue que par les animaux d'expérience, un titrage chez les hommes sains étant impossible. Si l'on considère la gravité des infections, il est à remarquer que des maladies graves, septicémie puerpérale mortelle, endocardite maligne, ne fournissent souvent que des échantillons de streptocoques dénués de pouvoir pathogène pour les animaux d'expérience usuels. D'autre part, existe-t-il même un rapport nécessaire entre l'intensité de l'hémolyse et l'intensité du pouvoir pathogène pour les animaux? Les streptocoques hémolytiques sont-ils les streptocoques virulents pour les animaux? Bordet, Besredka, Lingelsheim, Marmorek soulignent l'importance du rapport entre l'intensité de l'hémolyse et le degré du pouvoir pathogène pour les animaux. Certains auteurs ont même été jusqu'à prétendre titrer la virulence pour le lapin par le pouvoir hémolytique vis-à-vis des hématies de cette espèce. Mais la lecture du tableau précédent montre que si les échantillons franchement pathogènes pour la souris et le lapin hémolysent les globules de mouton, la réciproque n'est pas exacte : on rencontre des échantillons fortement hémolytiques, peu ou pas pathogènes pour la souris et le lapin. D'autre part nous n'avons pas trouvé dans nos recherches d'échantil-

lons franchement pathogènes pour le lapin et la souris et dépourvus de propriétés hémolytiques. Rappelons enfin que chez les streptocoques conservés *in vitro*, la persistance du pouvoir hémolytique s'oppose parfois à la baisse du pouvoir pathogène.

CONCLUSIONS.

Certains échantillons de streptocoques, d'origines diverses, produisent dans leurs cultures des substances hémolysant les globules rouges de mouton et de plusieurs espèces animales. Ces substances se forment également chez les animaux inoculés. Les milieux électifs pour la mise en évidence de l'hémolyse sont les milieux liquides additionnés d'humeurs animales. L'addition de glucose favorise le développement microbien, mais, à doses trop élevées, empêche l'hémolyse. La propriété hémolytique apparaît dans les cultures aérobies et anaérobies et disparaît à une époque variable suivant les échantillons de streptocoques; pour certains, l'hémolyse n'est observable que pendant un temps court, entre la septième et la seizième heure et disparaît peu à peu à partir de la seizième heure. Les substances hémolysantes existent, à un stade précoce du développement, dans les « liquides clairs »; à noter, par opposition, la remarquable résistance des streptocoques à l'autolyse. La dose hémolysante minimum de culture varie beaucoup avec l'échantillon microbien observé. Les substances en question disparaissent par le chauffage, l'addition d'antiseptiques. Elles agissent à une température optimum voisine de 37°. Injectées dans les veines du lapin et de la souris sous forme de cultures filtrées, elles peuvent produire l'hémolyse *in vivo*. Injectées au lapin, elles ne provoquent pas l'apparition d'antistreptolysine dans ses humeurs; presque tous les auteurs s'accordent là-dessus. *Ce caractère négatif nous paraît d'une grande importance et suffit à lui seul pour séparer à l'heure actuelle l'hémolysine streptococcique des hémotoxines microbiennes vraies.* Les substances streptococciques hémolysantes traversent les filtres. Leur nature demeure inconnue. Le pouvoir hémolytique d'un échantillon de streptocoque n'offre pas de relation nécessaire et constante avec le pouvoir pathogène vis-à-vis de la souris et du lapin.

**LA NUTRITION MINÉRALE DE LA CELLULE VIVANTE
ET LES VITAMINES
LA NUTRITION MINÉRALE
ET LA RÉSISTANCE NATURELLE DES VÉGÉTAUX
ET DES ANIMAUX AUX MALADIES INFECTIEUSES**

par M. P. MAZÉ.

Au cours de mes recherches sur la nutrition minérale du maïs, j'ai observé des faits qui présentent beaucoup d'analogies avec ceux que les nombreux travaux des auteurs sur les facteurs accessoires de l'alimentation ont mis en lumière (1).

Ces faits tendent à montrer que les vitamines se confondent avec les aliments minéraux.

On conçoit que les végétaux puissent être des producteurs par excellence de vitamines, puisqu'ils sont adaptés spécialement en vue de l'assimilation des aliments minéraux; mais il est vraisemblable que les animaux possèdent la même propriété, puisqu'ils sont capables d'emprunter une partie de leurs aliments minéraux à des composés inorganiques.

Cependant, de simples analogies ne valaient pas d'être signalées. Pour identifier les vitamines avec des aliments minéraux, il est nécessaire de s'appuyer sur des données expérimentales. Ce sont ces données que je résume dans ce mémoire.

J'ai reconnu en outre que les substances organominérales, que j'ai rapprochées des sécrétions internes, jouent, plus ou moins directement, chez les végétaux supérieurs, un rôle actif dans la défense de l'organisme contre les maladies parasitaires. Je montrerai qu'elles contribuent à assurer la même fonction chez les animaux.

(1) P. Mazé, Recherches de physiologie végétale (quatrième mémoire). Ces *Annales*, 28, 1914, p. 21; Chlorose toxique du maïs. La sécrétion interne et la résistance naturelle des végétaux supérieurs aux intoxications et aux maladies parasitaires. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 78, 1915, p. 98.

Comme introduction à cet exposé, il est indispensable de rappeler brièvement les observations que j'ai faites sur la nutrition minérale des végétaux, et que je me suis borné le plus souvent à énoncer sans les interpréter.

I. — LA NUTRITION MINÉRALE ET LES VITAMINES CHEZ LES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS.

Lorsqu'on supprime un élément indispensable dans une solution minérale capable d'assurer le développement du maïs jusqu'à la maturité de la graine, on constate toujours un ralentissement de la végétation suivi d'un dépérissement progressif qui se termine par la mort.

C'est au cours de ce dépérissement qu'on observe des accidents végétatifs qui sont caractéristiques pour chaque élément minéral.

Si on cherche à remédier à ces maladies, on parvient souvent à découvrir les relations qui existent entre un aliment minéral donné et une fonction physiologique.

J'ai fait dans cet ordre d'idées de nombreuses observations sur le rôle du manganèse, du zinc, du fer et du soufre ; si au lieu de supprimer isolément ces éléments dans la solution nutritive, on les supprime par couples, les résultats peuvent être très différents. Si enfin on recourt à des carences multiples, déterminées ou arbitraires, on assiste à des phénomènes aussi curieux qu'imprévus et qui tendent à développer largement les notions que l'on possède sur la nutrition minérale de la cellule vivante.

Je résumerai brièvement les faits dans l'ordre que je viens d'indiquer.

Chez les plantes privées de manganèse, le ralentissement de la végétation est accompagné d'une chlorose très nette ; mais la décoloration des feuilles n'est jamais complète, et elle n'est pas comparable à la chlorose produite par une disette de fer, caractérisée par la disparition de toute trace de pigment chloro-phyllien et carottinien ; les feuilles se rétrécissent beaucoup et perdent leur turgescence, puis la végétation s'arrête et la plante périt.

Si l'on dépose sur les feuilles chlorotiques, de préférence au moment où la décoloration devient nettement perceptible, des

gouttes de solution étendue (1/20.000) d'un sel soluble de manganèse, les cellules imprégnées de solution ne réagissent pas; mais si on procède de même et en même temps avec des gouttes de suc emprunté à un maïs sain et vigoureux, ou simplement avec des gouttes du liquide transsudé par les feuilles au cours de la nuit, les cellules du parenchyme qui absorbent l'extrait de ces liquides se colorent en vert foncé après un ou deux jours d'exposition au soleil.

Les sucs en question ont donc apporté l'élément manquant sous une forme assimilable, c'est-à-dire à l'état de combinaison organique puisque les composés minéraux du même élément ne produisent aucun effet.

L'assimilation des aliments purement minéraux n'est donc possible qu'en présence d'une réserve déterminée des mêmes éléments engagés dans des combinaisons organiques.

Les portions de parenchyme foliaire qui reverdissent dans les conditions indiquées ci-dessus reprennent leur activité assimilatrice et la tache verte, limitée d'abord à l'emplacement de la goutte de liquide, se développe et se propage dans le sens de la sève ascendante, puis dans le sens de la sève descendante, pour former une bande verte qui peut s'étendre à toute la longueur de la feuille. Les cellules qui ont absorbé le composé organomanganique apporté par le suc normal élaborent de nouvelles quantités du même composé aux dépens des traces de manganèse minéral qui circulent dans la sève et le cèdent aux cellules voisines et c'est ainsi que la tache verte s'étend peu à peu sur toute la longueur de la feuille. Le résultat dépend de l'état de dépérissement de la plante au moment où l'on fait l'expérience et de la richesse des sucs normaux en principes actifs (v. p. 965).

Le reverdissement n'est pas assuré d'une manière définitive. Les parties du parenchyme où la chlorophylle a été régénérée se décolorent par la suite progressivement; les cellules insuffisamment alimentées en manganèse minéral présentent de nouveau au bout de quelques jours, quelquefois de quelques semaines, des symptômes de disette.

La carence provoque donc une destruction progressive des substances organominérales, c'est-à-dire un retour de l'élément minéral à l'état de composé inorganique.

Si on alimentait la plante chlorotique en manganèse minéral au moment où on lui a conféré le pouvoir de l'assimiler par une goutte de suc normal, elle reconstituerait peu à peu sa réserve de composés organomanganiques et reprendrait son développement.

J'ai assimilé ces substances à des sécrétions internes; elles sont en effet spécifiques car les sucs empruntés à d'autres espèces végétales restent sans effet dans les mêmes conditions; il s'agit donc bien de composés élaborés par les cellules assimilatrices du maïs. Ce caractère ne permet pas de les identifier avec les vitamines; mais on doit reconnaître que leurs effets ne se distinguent en aucune manière de ceux que produisent ces dernières.

La spécificité n'est cependant pas absolue; on peut en effet greffer bon nombre d'espèces végétales différentes les unes sur les autres. Dans ces conditions, ce sont les substances élaborées par le greffon qui nourrissent le porte-greffe; la distinction basée sur la spécificité est alors sans valeur; les substances organominérales remplissent exactement le rôle de vitamines vis-à-vis d'espèces « intergreffables »; on peut donc avancer légitimement que les vitamines sont des substances organominérales et que les éléments minéraux qui en constituent les principes actifs sont aussi des vitamines dans la mesure où ils sont assimilés.

Ces faits peuvent être généralisés, car ils ne sont pas particuliers au maïs.

On en déduit par conséquent qu'une cellule vivante, malgré les apparences, est incapable, dans des conditions déterminées, d'utiliser un élément minéral bien qu'il constitue pour elle un aliment normal. Pour qu'une cellule vivante puisse assimiler un élément inorganique, M, il faut, je le répète, que son suc cellulaire ou son protoplasme contienne une certaine quantité de cet élément à l'état de composé organique; en d'autres termes, il faut que le rapport

$$\frac{\text{M. organique}}{\text{M. minéral}}$$

ne soit pas inférieur à une valeur donnée, variable vraisemblablement suivant les espèces.

Cette condition est toujours satisfaite chez les végétaux puisque les réserves minérales de la graine la remplissent vis-à-vis de la plantule; lorsque les premières feuilles sont pourvues de chlorophylle, les cellules assimilatrices assurent largement l'élaboration des substances organominérales.

Elle est à plus forte raison la règle chez les animaux qui empruntent la plus grande partie de leurs aliments minéraux à des combinaisons organominérales.

On a vu qu'une goutte de suc ou plus simplement une goutte de liquide de transsudation de feuille normale renferme un composé organique du manganèse qui permet aux cellules du parenchyme foliaire qui en sont privées de reprendre leurs fonctions assimilatrices et de reconstituer ce même composé indispensable à la vie de la plante.

Une substance essentielle peut donc être éliminée ou détruite par la cellule vivante au cours de ses échanges avec le milieu nutritif, même dans des conditions où elle est incapable de la remplacer.

On aurait pu s'attendre à constater l'existence chez la cellule vivante d'un pouvoir de rétention plus grand vis-à-vis des éléments qui lui sont indispensables, lorsqu'elle est placée en présence d'une pénurie de ces éléments; ce pouvoir existe chez les végétaux supérieurs et se manifeste régulièrement dans les cas de disette, par la suppression de la transsudation nocturne qui est une des deux voies d'élimination des éléments rares. Dans ces conditions, la déperdition par les feuilles cesse; mais les échanges par les racines continuent; il se trouve même que toute l'activité végétative se porte sur ces organes lorsqu'on cultive la plante dans une solution incomplète. L'élimination se poursuit donc par les racines tant que les échanges persistent. On peut provoquer une décoloration complète des feuilles d'une plantule de maïs cultivée dans une solution ne renfermant qu'un seul composé minéral, par excrétion du fer apporté par la graine. La disette minérale s'établit donc automatiquement par voie d'excrétion lorsque la cellule vit exclusivement sur ses réserves.

Si l'on remarque maintenant que la plupart des éléments qui agissent à faible dose ne sont tolérés qu'à l'état de dilution extrême pouvant atteindre l'ordre du 1 p. 500.000, on en conclut

que la plante ne peut en faire des réserves, en raison de leur action toxique. Ils doivent donc être déversés d'une façon continue dans la circulation générale, condition qui impose la stricte observation de la loi de l'équilibre des solutions nutritives, que j'ai appelée loi des rapports physiologiques.

Il existe cependant, on le sait, chez quelques végétaux supérieurs et chez les animaux, des cellules ou des glandes qui accumulent un élément rare et qui ont pour fonction d'en régler la circulation; mais ce mode de dosage n'est pas général, de sorte que la disette peut se faire brusquement sentir quand il s'agit d'aliments minéraux qui sont tolérés seulement à des doses infinitésimales.

Des observations à peu près identiques peuvent être faites sur le rôle du zinc.

Mais les effets d'une carence simultanée de manganèse et de zinc se manifestent d'une manière bien différente.

La plante périt brusquement sans symptômes prémonitoires après avoir formé trois ou quatre feuilles normales. Suivant toutes les apparences, ce sont les racines qui périssent les premières, car la solution nutritive pénètre librement dans les faisceaux vasculaires; elle suinte à travers les stomates aquifères particulièrement à l'insertion de la feuille sur sa gaine, où elle laisse en s'évaporant un extrait constitué surtout par des nitrates et des phosphates.

Les feuilles enroulées et pendantes prennent une couleur foncée, avec des reflets métalliques, exactement comme des feuilles de maïs qui souffrent de la sécheresse.

Tout se passe comme si les cellules absorbantes avaient été détruites brusquement par intoxication. La solution nutritive s'est substituée au milieu interne constitué par la sève brute, entraînant rapidement la mort de la plante et la transformant en un système où les forces capillaires fonctionnent sans entrave, comme dans une mèche de coton (1).

Tous ces faits montrent que les effets de la carence sont spécifiques et se manifestent sur des fonctions déterminées suivant les éléments qui manquent.

(1) P. MAZÉ. *Loc. cit.*

La spécialisation est encore plus nette lorsqu'il s'agit d'une fonction définie, comme l'assimilation du gaz carbonique par les feuilles. On sait depuis longtemps que la privation de fer provoque la décoloration complète des jeunes feuilles formées en présence d'une disette de cet élément.

J'ai montré que le maïs privé de soufre présente exactement les mêmes accidents de chlorose.

Si on cultive deux lots de plante, l'un dans une solution privée de fer, l'autre dans une solution privée de soufre, la chlorose se montre à peu près simultanément dans les deux lots. Les jeunes feuilles entièrement décolorées se développent pendant quelques jours et la végétation s'arrête. Après un repos plus ou moins prolongé, les feuilles de la base se dessèchent graduellement, et libèrent de petites quantités de fer ou de soufre, qui circulent dans la sève; on assiste alors à une recoloration très nette des feuilles chlorotiques (1).

A partir de ce moment, les feuilles vertes anciennes continuent de dépérir et une plante naine s'édifie lentement aux dépens du fer ou du soufre qu'elles cèdent à la circulation.

Si on répartit sur les feuilles chlorotiques quelques gouttes d'une solution très étendue d'un sel de fer ou d'un sulfate, la chlorophylle apparaît déjà après un jour d'insolation; les taches vertes s'accroissent de jour en jour, mais elles restent limitées aux diamètres des gouttes qui leur ont donné naissance lorsque la concentration des solutions employées ne dépasse pas 1 p. 20.000; elles ne s'étendent pas comme celles que l'on observe avec le manganèse.

Si le fer et le soufre à l'état minéral sont utilisés par les feuilles chlorotiques contrairement à ce qui se passe pour le manganèse et le zinc, c'est parce que le parenchyme incolore renferme du fer et du soufre à l'état organique, comme on peut le vérifier facilement, ces deux éléments étant nécessaires à la constitution de la matière protoplasmique. Les conditions imposées par le rapport

$$\frac{\text{M. organique}}{\text{M. minéral}}$$

y sont toujours satisfaites.

(1) P. MAZÉ. *Loc. cit.*

Le fer et le soufre présents dans les feuilles vertes remplissent donc au moins deux fonctions indépendantes, une fonction plastique et une fonction chimique, mais c'est leur rôle d'éléments constitutifs de la matière vivante qui prime la fonction d'assimilation de l'acide carbonique, ou plus exactement les transformations chimiques qui aboutissent à la réduction de l'acide carbonique.

On peut par conséquent supprimer une fonction déterminée de la cellule vivante par une disette minérale mesurée, lorsque la fonction n'est pas indispensable à la vie de la cellule et assurer la récupération de cette même fonction par l'apport d'un supplément de l'élément inorganique approprié.

Cet élément est assimilé; il est alors retenu énergiquement par la cellule; c'est ainsi que les taches vertes produites par le fer ou le soufre durent aussi longtemps que la vie de la feuille; mais les cellules incolores limitantes ne bénéficient pas de ce voisinage.

Le fait le plus surprenant dans ces phénomènes, c'est la disparition des pigments ou leur régénération sous l'influence d'éléments minéraux qui n'en font pas partie. Mais on n'a pas le droit de s'en étonner si l'on considère que la chlorophylle ne doit être, quoi qu'on en pense, qu'un transformateur d'énergie.

Puisque le processus chimique de la réduction de l'acide carbonique est assuré par des composés organominéraux du fer et du soufre, agissant comme catalyseurs spécifiques, les pigments sont non seulement inutiles, lorsqu'il y a pénurie de Fe ou de S, mais encore dangereux en ce sens que l'élévation de température résultant de la transformation de l'énergie lumineuse met la vie de la cellule en péril. Les conditions mêmes de la vie exigent donc que la cellule les détruise quand la fonction assimilatrice est supprimée, pour les reconstituer dès que l'assimilation devient possible. La chlorose est dans ce cas une réaction de défense et non un symptôme de maladie, et c'est parce qu'elles sont normales que les cellules chlorotiques assimilent si facilement le fer et le soufre inorganiques.

Il est donc légitime de dire que ces deux éléments remplissent le rôle de vitamines vis-à-vis de la fonction chlorophyllienne, fonction nécessaire à la croissance de la plante.

Si l'on se trouve par conséquent en présence d'une plante

chlorotique incapable de pousser, on pourra lui conférer le pouvoir d'assimiler et de se développer :

1° par un composé organique ou inorganique renfermant du fer ;

2° par un composé organique ou inorganique renfermant du soufre ;

3° par un composé organique ou inorganique renfermant du fer et du soufre à la fois. *Cela revient à dire que la croissance de la plante est assurée dans ce cas particulier par 3 vitamines distinctes, et qu'il existe nécessairement plus de vitamines que d'éléments minéraux indispensables à la vie de la cellule.*

On doit donc pouvoir mettre encore en lumière de nombreuses vitamines à côté de celles que l'on connaît déjà, et l'on peut avancer dès maintenant que *les vitamines définies par les auteurs, jusqu'à présent, sont constituées par des groupes de composés minéraux ou organominéraux, où chaque élément minéral, c'est-à-dire chaque principe actif, représente un catalyseur chargé d'assurer une des diverses phases d'une fonction physiologique.*

On peut aller plus loin dans la combinaison des carences du milieu nourricier. Dans cet ordre d'idées j'ai réalisé des carences totales ou multiples en cultivant la plante dans de l'eau distillée ou dans une solution constituée par un seul sel alimentaire : nitrate de sodium, ou de potassium, ou de calcium, etc... à la concentration de 1 p. 1.000 ; j'ai fait germer des embryons de pois privés de leurs cotylédons et par conséquent de la presque totalité des réserves de la graine, et spécialement des composés organominéraux constituant les « sécrétions internes » ou vitamines spécifiques.

Quand on fait pousser des plantules de maïs dans l'eau distillée, elles vivent pendant des semaines et des mois sans gagner de poids, mais sans présenter d'autre caractère anormal ; la plantule végète en effet aux dépens des réserves séminales renfermant tous les éléments minéraux nécessaires à sa formation, dans les proportions établies par la plante mère, et équilibrées de manière à satisfaire à la loi des rapports physiologiques.

Dans les solutions minérales pourvues d'un seul sel, la carence peut être considérée comme pratiquement totale aussi. Mais les plantules de maïs s'y comportent tout autrement que dans l'eau distillée. Elles se développent sensiblement mieux au début; l'activité végétative se porte surtout sur les racines dont les axes principaux, peu ramifiés, atteignent jusqu'à 2 m. 20 de longueur; mais le poids final des plantules est inférieur à celui des graines dont elles proviennent.

Les deux-trois premières folioles sont vertes; les suivantes ne présentent pas la moindre trace de pigment, surtout si leur formation coïncide avec une période de jours très ensoleillés.

Si on dépose sur les feuilles décolorées une goutte d'azotate de fer à 1 p. 20.000, on constate que la décoloration est due à un manque de fer.

On peut donc provoquer une disette brusque de fer en faisant pousser des plantules de maïs dans une solution ne renfermant que du nitrate de sodium, par exemple, à 1 p. 1.000. Le rôle de ce sel a consisté surtout à modifier profondément la composition du milieu nutritif (solution + albumen), au point de vue de la loi des rapports physiologiques; l'azote total par litre mis à la disposition de la plantule était multiplié par un coefficient égal à 15. La disparition d'un composé organo-ferrique nécessaire à l'assimilation de l'acide carbonique peut donc être obtenue par des moyens tout à fait différents de ceux que la logique indique. Il n'est donc pas étonnant que l'on se soit demandé si les vitamines existent réellement ou si elles ne sont point simplement constituées par un état particulier des molécules de substances alimentaires.

Que se passerait-il avec une solution renfermant à la fois du nitrate de sodium à 1 p. 1.000 et du nitrate de fer à 1 p. 20.000 ou p. 50.000? On peut supposer qu'il n'est pas impossible qu'une autre carence simple se manifeste encore, et qu'elle intéresse l'élément le plus indispensable après le fer, le soufre vraisemblablement, étant donné sa similitude d'action avec celle du fer dans la fonction chlorophyllienne. Cette expérience n'a pas encore été réalisée, mais elle ne tardera pas à l'être.

Les embryons de pois privés de cotylédons, cultivés dans une

solution minérale complète additionnée de 0,5 ou 1 p. 100 de saccharose, acquièrent un développement notable; les racines normales, ramifiées, atteignent 5-6 centimètres; la longueur de la tigelle varie de 3 à 5 centimètres; son diamètre, qui est normal, s'étrangle brusquement à l'extrémité où le bourgeon, qui reste à l'état embryonnaire, forme une petite tache brune sans organisation visible à l'œil nu.

Je n'ai pas réussi jusqu'à présent à obtenir des plantules normales avec des embryons ainsi traités; ces expériences sont restées jusqu'ici inédites, leur but n'étant pas encore atteint. Mais les résultats observés ont néanmoins une signification précise.

Je dois ajouter que des embryons placés sur une pâte obtenue au moyen de farine de pois complète, assez consistante et stérilisée à l'autoclave, ne présentent pas le moindre signe d'évolution.

L'ablation des cotylédons prive l'embryon de la presque totalité de ses aliments naturels; néanmoins, les racines et la tigelle trouvent dans la solution nutritive tout ce qui est nécessaire à leur développement. Si le bourgeon demeure inerte, c'est parce que la solution ne réalise pas les mêmes conditions en ce qui concerne les feuilles. Si je rappelle que des graines normales de pois produisent, dans le même milieu non sucré, des plantes qui forment deux-trois gousses pourvues de graines normales, on peut affirmer que la solution renferme tous les éléments minéraux indispensables. Il en résulte que l'ablation des cotylédons prive l'embryon des substances organominérales nécessaires à l'évolution des feuilles, dans une proportion telle que la valeur du rapport

$$\frac{\text{M. organique}}{\text{M. minéral}}$$

étant trop faible pour assurer l'assimilation d'un ou plusieurs éléments minéraux M. indispensables au développement du bourgeon, les feuilles restent à l'état embryonnaire.

Il est donc possible de constituer des milieux nutritifs capables d'assurer le développement normal de quelques organes d'une plante pendant que d'autres restent à l'état embryonnaire; la désharmonie est due à une nutrition minérale insuffisante.

Comme conséquences directes de l'ensemble des observations qui précèdent, on peut prévoir que la recherche d'une ration synthétique composée de substances pures capables d'assurer la vie normale des animaux constitue un problème insoluble; toutes les tentatives faites depuis celle de Lunin (1881) ont d'ailleurs échoué comme elle. La purification chimique a pour effet d'éliminer toutes les substances organominérales; on y parvient difficilement, mais il suffit que l'une d'elles soit écartée pour que les animaux périssent; l'addition d'un mélange de sels à la ration ne peut être qu'une précaution pour le moins inutile en pareil cas.

On peut affirmer aussi que le développement des microbes en milieu purement minéral additionné d'un aliment ternaire pur est théoriquement impossible.

Si on n'introduit en effet que quelques germes dans un volume de solution suffisamment grand, le mécanisme des échanges provoque l'élimination de quelques composés organominéraux dont la perte arrête l'évolution de la culture; les germes ensemencés passent à l'état de vie latente.

C'est ce qu'on observe en particulier avec la levure; le fait a été si souvent enregistré au cours des nombreuses recherches sur l'action des vitamines qu'on a mis en doute les résultats de Pasteur sur la fermentation alcoolique en milieu composé de cendres de levure et de sucre candi. Ils ne se justifieraient que par la présence de vitamines apportées par le sucre insuffisamment purifié; cette explication est plausible, mais elle ne s'applique pas aux expériences de Pasteur.

La cause primordiale, c'est la décroissance, dans la cellule de levure, de la valeur du rapport

$$\frac{\text{M. organique}}{\text{M. minéral}}$$

lorsque le volume du liquide est infini par rapport au nombre de cellules ensemencées.

Mais si ce dernier est assez grand pour enrichir le milieu en substances organominérales et pour maintenir la valeur du rapport ci-dessus à un chiffre convenable, la culture se développe sans difficulté comme tous les expérimentateurs l'ont

constaté. Pasteur avait sûrement mis en pratique ce moyen infaillible.

Chacun sait d'ailleurs qu'il n'est pas toujours nécessaire de l'appliquer. Le résultat est subordonné à la perméabilité de l'enveloppe protoplasmique. Il y a des cellules qui retiennent énergiquement leurs diastases par exemple, d'autres qui les laissent diffuser avec la plus grande facilité.

Les spores de moisissures se développent infailliblement sur les milieux minéraux additionnés d'un glucide. Bien mieux, M. Winogradsky a montré que le *Clostridium pasteurianum* se multiplie dans un milieu minéral sucré privé d'azote combiné; mais le corps du microbe étant constitué en grande partie par des matières azotées, la fixation de l'azote qui est le résultat d'un travail intracellulaire se fait néanmoins dans les mêmes conditions que chez les microbes fixateurs qui ne se développent qu'en présence d'azote combiné.

Il est donc vraisemblable que les exigences particulières des microbes concernant la composition des milieux de culture relèvent d'une différence de perméabilité des enveloppes protoplasmiques. Si l'on ne tient pas assez compte de toutes ces conditions dans la préparation des solutions nutritives, on aboutit nécessairement à des résultats contradictoires; ces résultats n'en sont pas moins aussi exacts les uns que les autres, mais ils ne sont pas également intéressants.

On peut citer de nombreux exemples de résultats contradictoires qu'aucune cause apparente ne semble justifier, mais que des raisons profondes expliquent facilement.

Dans un travail récent, M. Chr. Barthel s'est proposé de vérifier si le *B. radicicola* fixe de l'azote en milieu artificiel. Sa conclusion est qu'il n'en fixe pas, même en présence de caféine, substance toxique qui provoque la ramification du microbe (1).

La fixation de l'azote exigerait donc quelque chose qui n'existe pas dans les milieux artificiels et que la plante fournit à son hôte.

J'ai élucidé ce point particulier en 1897, en me plaçant dans des conditions favorables que l'on peut aujourd'hui préciser (2).

(1) CHR. BARTHEL, Centralanstalten för försöksändet på jodcbr. *Bakter. Avdeln.*, n° 43, Stockholm, 1926.

(2) P. MAZE, Fixation de l'azote libre par le bacille des nodosités des légumineuses: Ces *Annales*, 44, 1897, p. 44.

Pour obtenir des résultats positifs, il faut prendre deux précautions essentielles : la première, c'est de constituer un milieu nutritif supérieur à celui que la plante offre au microbe ; je l'ai remplie en préparant une décoction de graines de haricots, présentant dans ce cas particulier les propriétés d'un suc embryonnaire ; il est bon de rappeler que la richesse de la graine en substances organominérales est subordonnée à la fertilité du sol qui a alimenté la plante mère et aux conditions atmosphériques qui ont présidé à sa maturation (V. p. 965). Il faut donc avoir la persévérance d'essayer plusieurs échantillons de graines.

La deuxième précaution consiste à employer le *B. radicolica* au stade où il possède à un degré élevé le pouvoir de fixer l'azote gazeux.

Le microbe présente en effet un cycle évolutif très étendu aussi bien au point de vue morphologique qu'au point de vue physiologique.

Les formes les plus actives sont celles qui se rencontrent dans les nodosités très jeunes où elles n'ont pas encore subi l'action déprimante de la sève acide. C'est à des cultures issues de jeunes tubercules qu'il faut par conséquent accorder la préférence.

Les cultures conservées dans les milieux artificiels perdent peu à peu la propriété de fixer l'azote gazeux, de produire du mucilage et de former des tubercules sur les racines des légumineuses cultivées en milieu aseptique.

Les probabilités en faveur des résultats négatifs au point de vue de la fixation de l'azote en milieu artificiel sont donc nombreuses.

II. — LES FACTEURS ACCESSOIRES DE L'ALIMENTATION SONT CONSTITUÉS PAR LES COMPOSÉS ORGANIQUES ET INORGANIQUES DES ALIMENTS MINÉRAUX.

On a vu dans le chapitre précédent que les effets des *composés organominéraux spécifiques* sur la vie et les fonctions de la plante sont identiques à ceux des vitamines.

Il s'agit maintenant d'étendre ces résultats aux animaux.

En envisageant la question sous son aspect le plus simple,

on est conduit à rechercher si un élément minéral peut remplacer un facteur accessoire déterminé.

La tentative est délicate puisque les mélanges de sels nutritifs employés conjointement aux aliments énergétiques, au cours de nombreuses recherches dont les vitamines ont été l'objet, n'ont pas pu prévenir l'avitaminose des animaux soumis à l'expérience.

Il convient donc d'abord de recourir à une méthode de démonstration efficace.

Pour cela, il n'y a qu'à appliquer ponctuellement celle que j'ai suivie dans l'étude du rôle du soufre et du fer sur la reprise de la fonction chlorophyllienne chez les feuilles chlorotiques, *en ne perdant pas de vue le fait fondamental que les feuilles décolorées renferment du fer et du soufre organiques en quantité suffisante pour y entretenir la vie.*

On soumet donc deux lots d'animaux témoins à deux régimes respectifs de même composition globale, mais différant l'un de l'autre en ce sens que l'un renferme toutes les vitamines, tandis que l'autre est privé d'une quantité convenable d'une vitamine déterminée.

On forme d'autre part deux séries, A et B, de lots d'animaux qui reçoivent le régime déficitaire, mais additionné de doses croissantes de la vitamine qui manque, comprises entre les doses extrêmes que contiennent les régimes témoins; l'une des séries, B par exemple, reçoit en outre le groupe d'éléments minéraux capables de remplacer la vitamine supprimée.

Si l'on a vu juste, ce qui est généralement la règle lorsqu'on n'a pas hésité à exagérer le nombre d'éléments visés, on constate que l'avitaminose se fait sentir dans la série B à un degré de l'échelle des doses croissantes de vitamines plus voisin du régime déficitaire témoin que dans la série A. Les éléments minéraux sont en effet assimilés en quantité suffisante à partir d'une dose donnée de vitamines pour laquelle la valeur du rapport

$$\frac{\text{M. organique}}{\text{M. minéral}}$$

rend cette assimilation possible. Cette condition étant satisfaite, les éléments minéraux remplissent le rôle de vitamines.

On conçoit la suite des combinaisons nécessaires pour déterminer les éléments spécifiques.

Le procédé est général, mais son application est facilitée grandement lorsqu'on dispose comme critérium d'une fonction physiologique bien définie et facile à observer. Cette condition se présente chez des rats adultes nourris uniquement avec du lait écrémé desséché.

Les animaux soumis à ce régime conservent leur poids et vivent aussi longtemps que les témoins; mais ils ne se reproduisent pas, tandis que les animaux qui reçoivent de la poudre de lait entier se reproduisent généralement aussi bien que les témoins soumis à un régime normal.

Or, on sait que la séparation de la crème prive le lait écrémé de la plus grande partie du facteur A qui existait dans le lait entier. Toutes les fois que la fraction restante est assez élevée pour que le rapport

$$\frac{\text{M. organique}}{\text{M. minéral}}$$

ait une valeur suffisante pour assurer l'assimilation des éléments minéraux, on peut remplacer avec succès la fraction de facteur A entraînée dans la crème par une association convenable d'éléments minéraux.

Cependant, on peut prévoir aussi que ces expériences peuvent ne pas réussir quand la poudre de lait écrémé est assez riche en facteur A (v. p. 975) et qu'elle suffit à elle seule à entretenir la fécondité des animaux.

On déduit de là que les animaux élaborent des vitamines comme les plantes, ou plus exactement que les éléments minéraux sont des vitamines au même titre que leurs composés organiques, sous certaines conditions qui doivent être d'ailleurs toujours remplies dans une ration bien équilibrée.

C'est donc avec des éléments minéraux que la cellule animale crée ou élabore les substances organominérales qui constituent à un titre quelconque ses catalyseurs spécifiques.

Ce qui distingue la cellule animale de la cellule végétale, jusqu'à plus ample informé, c'est que la première peut assimiler des aliments organominéraux variés parce qu'elle est desservie par un appareil digestif, tandis que la cellule végétale n'utilise généralement que les substances élaborées par la

même espèce, et qui appartiennent déjà aux groupes des « sécrétions internes » (V. p. 951).

Il s'agit maintenant d'envisager les conséquences directes de ces faits et de vérifier jusqu'à quel point elles ont été mises en lumière soit par les nombreux travaux qui ont trait aux vitamines, soit par les connaissances que l'on possède sur la question de la nutrition générale de la cellule vivante.

1° On prévoit qu'il est possible d'arrêter le développement d'un être vivant par une alimentation pauvre en éléments minéraux déterminés, d'empêcher ou de favoriser le développement des organes de la reproduction et de faire à volonté des neutres, des mâles ou des femelles. C'est la règle chez beaucoup d'espèces d'hyménoptères : abeilles, fourmis, termites, etc... On sait depuis longtemps que cette évolution est commandée par la nature de la pâtée administrée aux larves, et que les insectes, plus habiles que les expérimentateurs, ne se trompent ni sur la nature des éléments nécessaires, ni sur leurs proportions.

2° On sait que les exigences en éléments minéraux des êtres organisés varient vraisemblablement entre des limites étendues. Raulin a montré que l'*Aspergillus niger* se développe dans un liquide sucré renfermant 8 éléments minéraux, non compris C, H et O, auxquels il faut ajouter Mn, comme l'a montré M. G. Bertrand, ce qui fait 9; le maïs en exige 15 (1).

Il en résulte que le maïs renferme bien plus de composés organominéraux différant par leur élément inorganique que l'*Aspergillus*, et vraisemblablement les champignons en général.

L'expérience prouve, en effet, que les champignons ne fermentent pas de facteur A, et si l'on a pensé en découvrir quelquefois des traces, rien ne prouve qu'elles n'existaient pas déjà dans le milieu nourricier.

3° Les animaux étant capables d'élaborer des vitamines, on est logiquement porté à supposer que quelques expérimentateurs ont réalisé les conditions favorables à cette élaboration

(1) P. Mazé, Recherche d'une solution purement minérale capable d'assurer l'évolution complète du maïs cultivé à l'abri des microbes. Ces *Annales*, 35, 1919, p. 439.

en raison de l'énorme variété de régimes qui ont été imaginés. On doit donc trouver dans la littérature des résultats qui sont d'accord avec cette hypothèse.

Effectivement, Hart, Steenbock et Ellis (1), ayant nourri des vaches avec des fourrages desséchés, constatent qu'elles produisent un lait qui possède des propriétés antiscorbutiques. Les cobayes nourris avec les mêmes fourrages deviennent scorbutiques; ils ne contractent pas le scorbut si on leur donne en même temps le lait sécrété par les vaches soumises au régime privé du facteur C. Les vaches ont donc élaboré le facteur C.

4° On peut prévoir aussi que les composés organominéraux étant essentiellement instables vis-à-vis des agents chimiques ou physiques, sont dans un état permanent d'évolution chimique et par conséquent de destruction; et si l'on considère que les vitamines sont constituées par des associations de ces substances, la perte de leur activité est subordonnée à la destruction du composé le plus fragile.

III. — FORMATION DES SUBSTANCES ORGANOMINÉRALES CHEZ LES VÉGÉTAUX. RÉSISTANCE DES PLANTES AUX MALADIES CRYPTOGAMIQUES ET AUX PARASITES ANIMAUX.

J'ai constaté que les substances organominérales jouant le rôle de « sécrétions internes » disparaissent totalement du suc cellulaire de la plante au cours d'une période de jours froids et pluvieux.

Quand le beau temps revient, le liquide de transsudation nocturne recueilli à la fin d'un jour chaud et ensoleillé ne renferme pas trace de ces substances; elles font leur apparition au bout de deux ou trois jours et atteignent en peu de temps un taux normal si les conditions atmosphériques restent favorables.

Leur élaboration est donc étroitement liée à une forte insolation, leur abondance engendre un état physiologique particulièrement vigoureux et favorise une croissance rapide de la plante.

Le suc des plantes normales guérit non seulement les

(1) HART, STEENBOCK et ELLIS, Influence of diet on the antiscorbutic potency of milk. *Journal of biological Chem.*, 42, 1920, p. 383.

feuilles rendues chlorotiques par une disette minérale déterminée, mais encore les feuilles partiellement décolorées à la suite de l'introduction dans la solution nutritive de métaux toxiques tels que le plomb et le cuivre, ou d'alcool méthylique à 2 p. 1.000, dont l'absorption continue donne naissance à du formol qui atteint dans les feuilles un taux assez élevé pour devenir nocif.

Il ne s'agit plus, dans ces conditions, d'une action simple ; le phénomène se présente comme la résultante des propriétés « antitoxiques » du suc complet ; l'expérience est physiologiquement équivalente à une transfusion du sang et c'est en reconstituant chez les cellules intoxiquées un milieu physiologique normal qu'on leur permet de reprendre toutes leurs fonctions.

Les mêmes propriétés interviennent dans les réactions de défense de la plante vis-à-vis des infections cryptogamiques et vraisemblablement des attaques de nombreuses espèces d'insectes.

Le mode d'acquisition de l'« immunité » chez la plante vis-à-vis des cryptogames s'est manifesté spontanément au cours de mes recherches sur la nutrition du maïs.

Les cultures étant toujours faites à l'abri des microbes, il s'y est produit quelques contaminations accidentelles dues à des champignons.

Au cours du printemps de 1912, un pied de maïs qui avait déjà développé trois ou quatre feuilles normales fut atteint d'une chlorose intense qui ne s'expliquait pas, étant donné la composition du milieu nutritif offert à la plante ; une colonie d'*Aspergillus niger* s'étant développée sur la base de la tige, à l'intérieur du flacon, l'accident pouvait légitimement lui être imputé.

Le dépôt de quelques gouttes d'une solution très étendue d'azotate de fer sur les feuilles chlorotiques établit qu'il s'agissait d'une chlorose due à une disette de fer. L'*Aspergillus* privait la plante de cet élément, soit en détruisant les acides organiques de la sève descendante qui, excrétés par les racines, assurent l'absorption des aliments minéraux insolubles, soit en détournant pour son compte la plus grande partie de fer circulant dans la sève ascendante.

La maladie s'aggrava avec le temps, puis disparut très rapidement, les conditions atmosphériques étant devenues très favorables à la végétation.

J'attribuai cette guérison spontanée à une élévation excessive de la température qui arrêta le développement de l'*Aspergillus*, tout en exaltant l'activité de la plante.

En 1914, le même accident survint dans les mêmes conditions et se termina de la même manière; mais les cultures étaient exposées au grand air au lieu d'être enfermées dans une véranda comme les premières; la température n'avait donc pas gêné l'*Aspergillus*.

Plus averti sur le rôle de la lumière dans la formation des substances organominérales dont les fonctions sont si importantes, je rattachai à l'influence de ces corps la guérison rapide et spontanée des diverses sortes de chloroses (1).

Si cette interprétation est juste, elle doit trouver de nombreuses confirmations dans l'histoire des maladies cryptogamiques, aussi bien que dans l'observation directe de leur évolution naturelle. Le mildiou de la vigne (*Peronospora viticola*), celui de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*), les rouilles des céréales (*Uredo*, *Puccinia*) envisagés de ce point de vue, fournissent des renseignements précis :

Les printemps et les étés humides, généralement froids, sont propices au développement et à l'extension des maladies cryptogamiques. Les trois précitées causent dans ces conditions des dégâts énormes. Par contre, les années chaudes et relativement sèches favorisent l'évolution des végétaux supérieurs dont la vigueur et la santé sont une garantie certaine de récoltes abondantes.

La résistance naturelle des plantes aux champignons parasites est donc assurée d'abord par le soleil et ensuite par la température élevée qui règne toujours à la faveur du beau temps.

Le printemps de 1926 a fourni, en France, une démonstration très nette de cette règle.

Pendant tout le mois de mai et le mois de juin jusqu'au delà du solstice d'été, le ciel est resté presque toujours couvert; le temps était pluvieux et froid.

(1) P. MAZÉ. C. R. de la Soc. de Biol. (loc. cit.).

Les céréales, qui étaient en avance à la fin d'avril, ont été envahies par de nombreux cryptogames et principalement par la rouille.

Dans les régions situées au sud de la Loire et où la température moyenne estivale est plus élevée que dans celles qui s'étendent au nord de cette limite, le blé est parvenu péniblement à la floraison avant la fin du mois de juin. La récolte y a été très déficitaire.

Au nord de la Loire, la végétation a évolué plus lentement; la plante n'avait pas formé tous ses organes aériens avant le retour du beau temps; elle a donc produit de nouvelles feuilles à partir du début de juillet, le beau temps s'étant maintenu sans interruption pendant tout l'été et une partie de l'automne.

Les organes jeunes et sains ont créé rapidement l'état de résistance active dû à l'accumulation des composés organominéraux dans la plante, de sorte que les maladies cryptogamiques ont été brusquement enrayées; le blé a fourni un rendement moyen.

La statistique agricole met ces influences en évidence d'une façon frappante :

La récolte de blé est fortement déficitaire dans son ensemble. Il en est de même de celle du seigle.

Celle de l'orge est normale. La récolte d'avoine est par contre élevée. Ce dernier résultat s'explique aisément : dans toutes les régions de grande culture, on ne cultive que l'avoine de printemps; son évolution s'est faite presque entièrement à partir de la fin de juin, sous un ciel toujours ensoleillé et dans des conditions de température qui se rencontrent rarement au cours d'une année normale, même exceptionnellement favorable. L'avoine d'hiver, qu'on ne cultive guère qu'en Bretagne, a réussi également comme toutes les autres céréales, dans cette région à climat estival très tempéré où la récolte est en retard de quinze jours en moyenne sur celle de la région de Paris.

J'ai pu suivre de près, dans les jardins de l'Institut Pasteur, les effets des conditions atmosphériques sur la végétation au cours du printemps et de l'été 1926 :

Des haricots nains semés au commencement du mois de mai

sont sortis de terre les 22, 23 et 24 mai, les seuls beaux jours du mois. Vers la fin de juin, à l'époque du solstice d'été, ils n'avaient formé que deux feuilles, chétives, chlorotiques, parsemées de taches parcheminées. Un grand nombre de pieds avaient péri et ceux qui restaient portaient sur les racines et la base de la tige des taches confluentes brunes produites par des bactéries et des champignons.

Quand le régime du beau temps s'est établi, quelques jours plus tard, de nouvelles feuilles se sont formées et la maladie a été enrayée radicalement; une végétation luxuriante s'est développée; la récolte a été très abondante.

L'état de résistance de la plante, c'est-à-dire son immunité naturelle, *s'établit donc en très peu de jours à la faveur d'une élaboration active de substances organominérales* due à une insolation intense et à une température élevée.

Aucune espèce végétale cultivée ne peut faire exception à cette règle qui ne dépend que des conditions atmosphériques. Tout ce que l'on peut dire, c'est que la fertilité du sol qui favorise l'absorption rapide d'une sève brute de composition bien équilibrée, facilite grandement l'assimilation des éléments minéraux pendant les jours ensoleillés et que la rétention des substances organominérales confère à la plante une immunité plus ou moins durable.

L'immunité ainsi acquise préserve aussi la plante, dans une certaine mesure, contre les parasites animaux.

J'ai eu l'occasion d'observer fréquemment le développement du puceron des céréales (*Aphis granaria*) sur le maïs cultivé en solutions aseptiques et voici ce que j'ai constaté :

1° Chez les plantes normales, le puceron fait son apparition sur les feuilles de la base de la tige lorsqu'elles commencent à jaunir; il attaque de préférence la région en voie de dépérissement. Si les conditions atmosphériques placent la plante dans un état de résistance affaiblie, l'invasion s'étend rapidement, mais n'atteint pas les feuilles qui sortent du bourgeon.

2° Dans une série de lots de plantes poussant dans des solutions différentes, l'aphidien choisit toujours les lots qui végètent dans les conditions les moins favorables, soit que les solutions

nourricières aient été mal équilibrées à dessein, soit qu'elles aient été privées d'un élément indispensable.

3° En 1911, année particulièrement chaude et favorable à la culture du maïs en milieux synthétiques, le puceron a envahi tous les lots de plantes dont les épis femelles sont demeurés stériles en raison de la composition des solutions nourricières (1); les lots qui ont produit des graines sont demeurés indemnes. Les plantes stériles ont continué à assimiler après la floraison et à accumuler des sucres jusqu'à la limite où leur concentration est devenue une cause de trouble pour les fonctions d'assimilation; elles ont été placées ainsi dans un état de moindre résistance qui a été le signal de l'invasion; celle-ci s'est étendue à toutes les parties de la plante avec une rapidité telle qu'il m'a été impossible de l'arrêter. Les axes des épis mâles même étaient enveloppés d'un véritable fourreau formé par les rangs serrés du parasite. Les piqûres ont produit un écoulement si abondant de suc que les flacons de culture et leurs supports étaient couverts d'un enduit sirupeux. Les maïs cultivés en pleine terre dans le jardin de l'Institut Pasteur ne portaient pas de parasites, pas plus, je le répète, que les pieds cultivés en milieu synthétique et qui avaient produit des graines. Parmi les plantes exposées aux mêmes conditions atmosphériques, celles qui étaient placées dans les conditions de milieu défavorables étaient donc les seules envahies par le puceron.

On pourrait citer d'autres exemples d'invasions d'insectes qui semblent confirmer ces faits; mais il est prudent de s'abstenir de généraliser sans procéder préalablement à des observations minutieuses.

On sait que l'*Eudémis* et la *Cochylis* de la vigne périssent lorsqu'il survient au cours de l'évolution larvaire quelques jours particulièrement chauds. On suppose qu'une température élevée, 35° et plus, est capable de les tuer. L'explication ne me paraît pas probante; les larves d'*Eudémis* et de *Cochylis* gênées par une température excessive peuvent, comme tous les insectes, rechercher momentanément un abri tempéré.

La piéride du chou (*Pieris brassicæ*) est favorisée au contraire

(1) P. Mazé, Recherches de physiologie végétale (deuxième et troisième mémoires). Ces *Annales*, 27, 1913, p. 651 et 1094.

par les printemps et les étés chauds et secs; sa larve anéantit dans ces conditions les plantations de chou. Il est donc difficile d'invoquer dans tous les cas « l'immunité » naturelle de la plante pour justifier sa résistance aux insectes déprédateurs; on pourrait avancer cependant qu'une sécheresse excessive place la plante dans un état de moindre résistance comme les pluies persistantes.

Les forestiers ont constaté d'autre part que les invasions débutent par les plantations qui végètent péniblement dans de mauvais terrains, ou par celles que de fortes gelées ont endommagées ou que des sécheresses prolongées ont affaiblies. Ces faits semblent donc confirmer aussi les conclusions que j'ai formulées au sujet du développement du puceron des céréales sur les cultures du maïs en milieux artificiels.

IV. — LA NUTRITION MINÉRALE ET L'IMMUNITÉ NATURELLE DES ANIMAUX.

L'étude des qualités alimentaires des fourrages et des légumes, conduite avec soin par une foule d'expérimentateurs, a montré que les plantes vertes sont riches en vitamines, et que ces vitamines, absorbées par les animaux, se répandent dans le sang et dans le lait où on peut les mettre en évidence et même les doser.

On peut maintenant exprimer ces faits en termes plus définis et dire: les fourrages verts riches en composés organominéraux assurent largement la nutrition minérale des herbivores et favorisent l'élaboration active des substances spécifiques (sécrétions internes) qui se répandent dans les divers tissus de l'organisme.

On peut se demander si la résistance naturelle des animaux aux maladies infectieuses est, comme chez les végétaux, une conséquence directe d'une alimentation abondante et bien équilibrée. A première vue, la corrélation est plausible, et l'étude de l'avitaminose a apporté à la question une contribution précieuse: les animaux carencés sont très sensibles aux maladies infectieuses.

Cependant, si l'on acceptait la conception actuelle de l'immunité naturelle telle qu'elle se déduit de l'immunité acquise, la

question ne se poserait pas ; mais il existe une catégorie de faits d'expériences se rattachant à l'immunité naturelle, qui ne cadrent pas avec les principes de la vaccination :

Le sérum des animaux renferme presque toujours des substances agglutinantes et bactéricides dont les effets ne sont pas spécifiques, car ils s'exercent indifféremment à l'égard des microbes pathogènes et des microbes banaux. Ces substances protègent par conséquent, dans une certaine mesure, l'organisme contre les maladies infectieuses ; elles créent un état de résistance, une immunité naturelle. Du sang, ces substances passent dans le lait, où elles ont été mises en évidence par Fokker, Coplans, Rosenau, etc... ; elles ne s'y conservent pas longtemps, trois ou quatre heures à la température ordinaire, vingt-quatre heures à 0° ; leur taux varie avec les saisons et avec les individus, et il peut descendre à un degré si minime qu'il devient très difficile de constater leur présence ; quelques expérimentateurs ont nié leur existence parce que leurs recherches ont coïncidé avec des périodes de déficience.

Les substances bactéricides du sérum normal ou du lait n'étant pas spécifiques, on peut s'adresser aussi bien aux ferments lactiques qu'aux microbes pathogènes pour déceler leur présence dans le lait. L'emploi des ferments lactiques purs dans les industries du lait constitue dès lors une méthode de démonstration permanente qui permet d'aborder l'influence du régime, des saisons, des sols, des régions, des races, etc., sur la teneur du lait en substances microbicides, et par conséquent d'élucider leur mode de formation.

Depuis longtemps, les fromagers m'avaient signalé les anomalies que présente le lait, plus spécialement au printemps, dans ses rapports avec le pouvoir coagulant de la présure. Mais les renseignements manquaient de précision, et il m'était bien difficile de les soumettre à l'expérience étant donné qu'il n'existait aucun moyen de régler la pureté des fermentations industrielles telles qu'elles se pratiquaient il y a peu d'années ; il n'y avait aucune raison de supposer d'autre part que le pouvoir bactéricide du lait pût gêner la fermentation lactique au point de réduire sensiblement la part qu'elle prend à la coagulation du lait et à l'égouttage du caillé. Mais depuis que j'ai introduit dans l'industrie fromagère l'usage des cultures pures

de ferments lactiques préparées par les industriels sur place, suivant une technique bactériologique rigoureuse, la présence de substances bactéricides dans le lait s'est imposée d'elle-même par des faits probants qui se sont manifestés de la manière la plus nette.

Les cultures se développent d'une façon très régulière dans les conditions ordinaires, mais régulièrement aussi au début du printemps, on constate dans certaines régions une diminution notable de l'activité des ferments dans la crème pasteurisée à 70° et dans le lait pasteurisé à 65°.

Les faits se déroulent de la façon suivante :

Les cultures entretenues pendant des années dans du lait écrémé stérilisé ne présentent à aucune époque des variations d'activité. Les cultures (levains) faites dans le même lait pasteurisé à 90-95° avec des semences empruntées aux précédentes, subissent des atténuations brusques qui se traduisent par des retards très nets dans la marche de l'acidification.

La crème et le lait pasteurisés respectivement à 65° et à 70°, et ensemencés avec des levains, fermentent très lentement et quelquefois l'acidification est à peu près nulle pendant les douze-quinze premières heures. Ces résultats sont tellement surprenants par leur soudaineté et leur intensité que l'on est porté à supposer la présence d'une forte dose d'antiseptique dans le lait, mais ce sont simplement les substances bactéricides du lait qui sont en cause.

Ces substances sont détruites entièrement par un chauffage de quinze minutes à 115°; elles sont détruites en partie par un chauffage de trente minutes à 90°-95°; elles résistent à 70° et à 65° pendant cinq minutes.

Les mêmes effets se manifestent, mais moins régulièrement et moins fortement en automne, au moment de la reprise de la végétation dans les herbages, à la suite de pluies abondantes survenant après une période de sécheresse.

Ces observations, faites dans la région des marais vendéens, font ressortir nettement l'influence des conditions atmosphériques; mais les rôles respectifs de la race et de l'individu ne sont pas moins évidents en apparence, puisque les effets enregistrés dans d'autres régions n'atteignent pas la même intensité.

L'expérience se poursuivant sur une grande échelle dans

plusieurs régions à climats différents, j'ai eu l'occasion de préciser les influences respectives des divers facteurs en jeu.

En octobre 1923, les mêmes faits s'observaient en effet dans une laiterie de la Basse-Normandie où la race laitière normande est très dominante; l'influence de la race n'est donc pas prépondérante; la nature du sol et la qualité des herbages passent également au rang de facteurs secondaires; ce sont les conditions atmosphériques qui règlent la richesse du lait en substances bactéricides. Cette conclusion résulte des observations suivantes :

L'été de 1923 a été froid et humide dans toute la région située au nord de la Loire; le mauvais temps a persisté si longtemps que les récoltes de céréales n'étaient pas toutes rentrées dans la région parisienne et dans le Nord avant la fin du mois d'août. Mais les régions littorales de la Normandie ont bénéficié ensuite d'un temps chaud et ensoleillé pendant toute la première quinzaine d'octobre.

C'est au cours de cette période de beau temps que le lait pasteurisé même à 90-95° s'est montré presque réfractaire à la fermentation lactique. L'action bactéricide s'est exercée plus fortement sur les ferments thermophiles que sur les ferments lactiques ordinaires. Les cultures, faites dans le même lait stérilisé à 115°, ne présentaient comme toujours aucune irrégularité.

Les effets des substances bactéricides se sont fait sentir pendant quelques jours seulement et ont débuté une dizaine de jours après le retour du beau temps; ils variaient d'intensité suivant la nature des terrains herbagers. Ils ont cessé complètement dès que le temps s'est modifié pour se mettre en harmonie avec la saison.

Les mêmes observations permettent en outre de préciser l'origine des substances bactéricides du lait :

Elle ne peut être attribuée en effet à une infection bénigne et insoupçonnée provoquant la formation d'anticorps dans le sang des animaux, car la pénétration des ferments lactiques dans l'organisme n'est pas particulièrement favorisée par le beau temps. D'ailleurs, l'influence de la pullulation des ferments lactiques thermophiles dans les milieux naturels devrait se faire sentir dans cet ordre d'idées au plus fort de l'été, et c'est ce qui n'a pas lieu. La formation d'anticorps par pénétration

de ferments lactiques dans l'organisme animal devrait donc être constante. Si la proportion d'anticorps dans le sang et dans le lait peut atteindre brusquement une valeur considérable, c'est que leur origine est ailleurs.

Les faits ne laissent plus de doutes sur cette origine : ce sont les plantes fourragères exceptionnellement riches en substances organominérales qui transmettent aux animaux qui s'en nourrissent une vigueur physiologique particulière et un état de résistance exaltée vis-à-vis des microbes infectieux ou banaux. Il ne faudrait pas en déduire que ces substances, qui jouent, comme on l'a vu, un rôle analogue chez la plante, ne font que changer de milieu en passant dans l'organisme animal pour y remplir les mêmes fonctions. Elles constituent simplement des aliments minéraux qui permettent à la cellule animale d'élaborer en abondance des substances spéciales (sécrétions internes, anticorps, diastases, etc.).

Il ne s'agit plus que d'expliquer la richesse occasionnelle et particulièrement frappante des végétaux en composés organométalliques à des époques de l'année à peu près invariables.

On y parvient sans peine si l'on remarque qu'elle se manifeste pendant les périodes qui suivent un repos prolongé de la végétation.

Au début du printemps, les plantes trouvent dans le sol une solution nutritive complète et particulièrement riche, résultant de l'accumulation des éléments fertilisants solubilisés par les microbes dans les profondeurs de la couche arable où la température est assez élevée pour entretenir les fermentations. Quand par conséquent, les conditions atmosphériques sont favorables à la végétation au cours des mois d'avril et de mai, l'élaboration des substances organométalliques devient extrêmement active. Au printemps, la terre est en amour, suivant l'expression imagée de A. Müntz.

Les mêmes coïncidences peuvent se réaliser en automne après une période de sécheresse, phénomène assez fréquent dans le Sud-Ouest de la France, ou ce qui est plus rare, à la suite d'un été froid et pluvieux comme l'été de 1925 en Normandie. Des pluies abondantes dans le premier cas, une succession de jours ensoleillés et chauds dans le second, provoquent une reprise active de la végétation qui bénéficie de la

réserve d'éléments fertilisants accumulés dans le sol au cours de la période d'arrêt ou d'accalmie.

L'ensemble de ces conditions exceptionnellement favorables ne dure pas longtemps; l'épuisement de la réserve alimentaire directement absorbable se fait sentir assez vite; il suffit d'ailleurs que quelques éléments indispensables ne se présentent plus qu'à l'état insoluble pour que la végétation reprenne un cours plus modéré et que les phénomènes exceptionnels cèdent la place à des faits normaux.

En résumé, il existe un rapport étroit entre la nutrition minérale des herbivores et l'abondance des substances microbicides dans le lait et dans le sang, et il est légitime d'admettre que les deux ordres de faits sont corrélatifs.

La résistance naturelle de la cellule vivante aux infections, à quelque degré d'organisation qu'on la considère, est donc une conséquence directe de sa richesse en composés organo-minéraux (1).

Le pouvoir bactéricide du lait ne peut passer inaperçu des cultivateurs, lorsqu'il se montre capable de ralentir sensiblement la fermentation lactique. Dans les régions de l'Ouest de la France, où le lait entre pour une part importante dans la ration de l'homme, les fermières en ont tiré, depuis des siècles, un parti judicieux pour fabriquer un lait caillé caractérisé par sa consistance gélatineuse et fortement visqueuse. Le lait est ensemencé immédiatement après la traite, c'est-à-dire à une température de 35°, avec un volume de lait caillé représentant 2 à 3 p. 100 du volume du lait frais ensemencé. Cette pratique a abouti à la sélection de ferments lactiques qui résistent à l'action microbicide du lait frais, et qui prédominent sur toutes les autres espèces au point de former une culture relativement pure.

RÉSUMÉ DES CONCLUSIONS.

L'importance des aliments inorganiques a toujours retenu l'attention des physiologistes. Ils ont reconnu depuis longtemps

(1) En n'envisageant maintenant que les observations de l'empirisme relatives aux anomalies que présente le lait dans ses rapports avec l'action de la présure, on voit que c'est surtout à l'atténuation de la fermentation lactique par les substances microbicides du lait qu'il faut attribuer ces faits.

que la matière vivante renferme de nombreux éléments minéraux. Mais ce sont les recherches de Pasteur et de son élève Raulin sur la nutrition minérale des microbes qui ont orienté les investigations dans une voie féconde en montrant le rôle que peuvent jouer certains aliments inorganiques sur le développement des microbes à des doses extrêmement faibles.

Les éléments minéraux constituent en outre les principes actifs de certaines diastases : c'est ainsi que M. G. Bertrand a montré que le manganèse est l'élément actif des oxydases. Ils jouent le rôle de codiastases, ou de compléments nécessaires à l'activation de la fonction diastasique ; le calcium est la codiastase de la trypsine (Delezenne) ; l'acide phosphorique, le complément de la zymase (Harden).

L'hémoglobine, l'hémocyanine, la chlorophylle, qui remplissent des fonctions remarquables dans l'organisme, sont des composés organominéraux bien définis. Les sécrétions internes, si elles ne sont pas toujours constituées par des composés de cette nature, sont élaborées avec leur concours.

Il n'est pas exagéré de dire que les aliments minéraux régissent les fonctions de l'organisme.

La détermination des éléments minéraux nécessaires à la vie d'une espèce présente donc une importance fondamentale.

Après avoir réalisé ce programme pour le maïs, j'ai abordé les rôles physiologiques respectifs des aliments minéraux envisagés séparément ou par groupes.

Les faits observés montrent que les végétaux supérieurs sont incapables d'assimiler un aliment minéral s'ils sont dépourvus de composés organiques renfermant cet aliment ; mais si on met à leur disposition des traces de ces substances organominérales, on leur confère la faculté d'assimiler les aliments inorganiques.

Les composés organominéraux remplissent chez les végétaux un rôle identique à celui des vitamines chez les animaux.

Ces derniers sont également en mesure d'élaborer comme les végétaux des composés organominéraux aux dépens des aliments inorganiques et de remplacer les vitamines par des substances minérales, ce qui revient à dire que les principes actifs des vitamines sont des éléments minéraux.

Les vitamines telles qu'elles sont définies jusqu'ici sont des groupes d'aliments minéraux et organominéraux.

Quand on soumet un organisme à une disette minérale graduée, il devient, à un moment donné, incapable d'élaborer les composés organominéraux qui président à des fonctions physiologiques; on supprime ainsi des fonctions déterminées suivant la nature de la disette minérale. On peut même arrêter complètement le développement de certains organes qui conservent l'état embryonnaire pendant que d'autres se développent sans gêne apparente.

La nature réalise par les mêmes moyens sans doute et avec une régularité parfaite, lorsque les conditions de milieu sont bien remplies, de semblables désharmonies; elle fait à volonté des mâles, des femelles ou des neutres; elle exagère le développement de certains organes et plie l'individu à un rôle social très spécialisé.

Pour donner une vue d'ensemble de ces faits, il convient de rappeler ici ce qu'il faut entendre par l'assimilation des aliments minéraux.

L'étude de la fermentation citrique m'a permis de la définir. Lorsqu'une culture de *Citromyces* en pleine évolution est brusquement privée d'un aliment minéral, en présence d'un fort excédent de glucides, on assiste à une production abondante d'acide citrique. Cette fermentation est due à un phénomène de désassimilation, c'est-à-dire à une protéolyse des substances protoplasmiques. L'acide citrique est le produit principal de cette digestion (1) des cellules âgées par les cellules jeunes qui empruntent par ce moyen au mycélium vieilli l'élément minéral qui leur manque.

On peut provoquer sa formation en limitant la teneur de la solution nutritive en l'un quelconque des aliments minéraux indispensables. Il en résulte que tous ces éléments font partie intégrante de la matière vivante. L'assimilation d'un aliment inor-

(1) L'anarchie cellulaire provoquée ainsi par la disette d'un aliment minéral est un phénomène très répandu dans le monde végétal et vraisemblablement aussi dans le monde animal. On en a vu des exemples bien définis à propos de la chlorose produite par une disette de fer ou de soufre.

ganique doit être considérée comme une incorporation directe aux substances protoplasmiques.

Le protoplasme possède donc une « charpente » minérale. On doit admettre par conséquent que les composés organominéraux qui forment les diastases, les sécrétions internes, les anticorps, etc., se détachent de l'édifice protoplasmique, puisque l'on peut mettre en évidence dans le suc d'un maïs normal et vigoureux des diastases, des « antitoxines », des anticorps, et enfin des composés organominéraux correspondant à chacun des aliments inorganiques nécessaires au végétal. Il est vraisemblable que l'on parviendra à connaître les propriétés spécifique de tous ces « outils » de la cellule avec le concours des méthodes physiologiques.

Il ressort aussi de tous ces faits que les éléments inorganiques impriment à la matière vivante un caractère de complexité extrême en raison du nombre illimité de combinaisons qu'ils peuvent former avec elle. La nature en a tiré parti, bien plus que des fonctions chimiques, en fait peu nombreuses, formées de C, H, O, Az, pour multiplier à l'infini les espèces vivantes avec le concours d'un nombre relativement faible d'éléments inorganiques.

Les capacités chimiques d'une espèce sont liées de toute évidence au nombre d'éléments minéraux qui lui sont nécessaires. Plus ce nombre est élevé, plus ses capacités chimiques sont développées. Ce qui caractérise les végétaux supérieurs, ce n'est pas leur pouvoir de réduire l'acide carbonique, mais bien l'origine de l'énergie qu'ils mettent en œuvre pour cela.

On est fondé à admettre que l'organisme animal est en mesure de réduire le CO_2 et que ces capacités chimiques sont bien plus développées que celles de la plante.

Quand il s'agit par conséquent d'assurer le développement rapide et la vigueur d'un être vivant, il faut avant tout lui fournir les éléments minéraux qui lui sont indispensables, et, comme l'expérience l'a démontré, dans des proportions bien définies, régies par la loi des rapports physiologiques. On peut faire varier la nature et la proportion des aliments énergétiques dans des limites très étendues suivant la règle de l'isodynamie; on ne peut constituer un milieu nourricier ou un régime privé

d'un seul aliment inorganique sans rendre la vie impossible. Mais les éléments minéraux nécessaires à la plupart des êtres vivants restent à déterminer. C'est pour cela que la science de l'alimentation se réduit jusqu'à présent à un empirisme plus ou moins éclairé. On avait pensé l'engager dans la voie rationnelle en s'appuyant sur les données de l'Energétique, et on a, en effet, réalisé par ce moyen des progrès considérables. Mais on était loin de tenir les principes d'une alimentation scientifique.

La notion du rôle des aliments minéraux remonte à Olivier de Serres, qui professait que l'humus ne valait que par les cendres qu'il renferme, et la base de l'opothérapie doit être également recherchée dans le même ordre d'idées, puisque les organes renferment nécessairement les combinaisons organo-minérales qui président à leurs fonctions chimiques.

Une autre condition nécessaire à la conservation de l'individu et de l'espèce, c'est sa faculté de résister aux maladies parasitaires. On conçoit, en effet, qu'une maladie contagieuse puisse atteindre un degré de virulence suffisant pour anéantir une espèce végétale ou animale. Mais en règle générale, les invasions parasitaires et les épidémies ne sont pas aussi meurtrières; il y a toujours des individus qui résistent.

L'immunité naturelle des végétaux est une conséquence directe d'une alimentation minérale riche et complète et de conditions atmosphériques favorables à une élaboration active de composés organominéraux qui sont les facteurs immédiats de cette immunité.

Il en est de même chez les animaux. La richesse du lait et par conséquent du sang en substances microbicides varie chez les vaches laitières dans des proportions énormes; elle est liée à la richesse des fourrages en substances organominérales. La présence de ces substances coïncide avec un état d'immunité qui s'étend indistinctement aux microbes pathogènes et banaux. Inversement, une nutrition minérale insuffisante est la cause immédiate de nombreuses maladies organiques et d'infirmités mal définies, et elle crée un état de dépression physiologique et par conséquent de réceptivité générale vis-à-vis des maladies parasitaires. J'ai montré par des faits d'expérience et par des résultats statistiques comment s'établit cet état de réceptivité

chez les végétaux supérieurs privés de lumière et de chaleur ; chez les animaux et chez l'homme, c'est la famine d'une part, la guerre de l'autre, qui préparent le terrain aux épidémies dévastatrices.

L'immunité dite acquise n'est qu'une exaltation de l'immunité naturelle vis-à-vis d'un microbe donné, sous l'influence d'une cause accidentelle (maladie) ou provoquée (vaccination).

En résumé, l'immunité, sous quelque forme qu'on l'envisage, dépend en définitive de la capacité chimique actuelle de l'organisme. Elle s'exerce aussi bien vis-à-vis des poisons minéraux que des toxines végétales ou animales : la levure cultivée en présence de fluorure de sodium se protège en insolubilisant le fluor à l'état de fluorure de calcium ; si on la met en présence d'acide sulfureux ou d'un sulfite, elle forme une combinaison d'acide sulfureux et d'aldéhyde privée de toxicité ; dans un milieu fortement alcalinisé, avec de la soude par exemple, elle fait de l'acétate de sodium ; il n'est pas douteux que d'autres corps toxiques de composition chimique définie provoqueraient la formation de composés non toxiques. Le résultat est simple ; mais la réaction défensive est compliquée, car elle oriente toute l'activité chimique de la cellule dans un sens anormal en apparence ; en réalité, il ne s'agit que de l'exaltation de fonctions chimiques normales. La neutralisation ou même la destruction des toxines vraies est identique quant au principe du mécanisme chimique, et elle n'offre pas plus de difficulté pour un organisme physiologiquement vigoureux.

QUELQUES RÉSULTATS ÉLOIGNÉS DU TRAITEMENT DE LA MALADIE DU SOMMEIL PAR LA TRYPARSAMIDE

par G. LE DENTU.

(*Institut Pasteur de Brazzaville, Afrique équatoriale française.*)

Du mois de novembre 1924 au mois d'octobre 1925, la tryparsamide a été expérimentée, à l'Institut Pasteur de Brazzaville, sur 130 malades aux différents stades de la seconde période de la trypanosomiase.

La plupart de ces observations ont fait l'objet du remarquable mémoire de Laigret, paru dans ces *Annales* (1). Notre intention n'est pas de revenir sur ce travail et d'amplifier de quelques unités les chiffres déjà publiés. Il nous paraît plus intéressant d'exposer seulement les résultats éloignés obtenus par le traitement.

Aussi, laissant délibérément de côté toutes les observations qui n'ont pu être suivies que pendant un semestre, n'envisagerons-nous ici que les malades dont le traitement a été suspendu pendant au moins neuf mois, exception faite pour certaines rechutes qui se sont produites avant ce délai et ont été soumises à de nouvelles cures de tryparsamide.

Le plus grand nombre des observations ainsi comprises remontent de treize à dix-huit mois, ce qui, en y comprenant la période de traitement, suppose un an et demi à deux ans de surveillance médicale.

Parmi ces 130 malades, quelques-uns sont morts avant un délai d'observation suffisant, soit de trypanosomiase, soit d'affections intercurrentes. D'autres plus nombreux ont cessé de se présenter à la visite — sans autorisation le plus souvent — présomption qu'ils se sentaient en assez bon état pour effectuer

(1) J. LAIGRET, Traitement de la trypanosomiase humaine par la tryparsamide. Ces *Annales*, n° 3, mars 1926, page 173.

les multiples déplacements chers à l'indigène. Nous savons d'ailleurs que quelques-uns exercent régulièrement un métier au Congo belge, et peuvent par conséquent être légitimement considérés comme guéris.

64 cas, rentrant dans les conditions exposées ci-dessus, ont pu être réunis; nous allons les passer en revue au cours de ce travail, selon l'ordre adopté dans le mémoire précité.

1° SECONDE PÉRIODE AU DÉBUT.

Cette catégorie ne compte que 4 malades, dont deux sont apparemment guéris depuis treize et dix-huit mois après cessation de tout traitement.

XVI-31. — Fatou (Clotilde), femme traitée quatre ans auparavant par l'atoxyl-émétique.

Novembre 1924 : L. C. R., 70 cellules, 0,40 albumine, OT.

Reçoit en décembre 1924 et avril-mai 1925, deux séries de tryparsamide formant un total de 46 gr. 50 (0 gr. 34 par kilogramme).

Juillet 1925 : L. C. R., 26 cellules, 0,30 albumine, OT.

Novembre 1925 : L. C. R., 9 cellules, 0,25 albumine, OT.

Décembre 1925 : L. C. R., 15 cellules, 0,25 albumine, OT.

Le second succès est dû à un traitement mixte (tryparsamide, atoxyl, émétique), imposé par la faible quantité de tryparsamide disponible à ce moment-là.

XXIV-69. — Kono, fillette de onze ans, poids 27 kilogrammes.

Juillet 1925 : Ganglions; présence de trypan.

L. C. R. : 70 cellules, 0,50 albumine, OT.

Reçoit, du 9 juillet au 2 octobre, 3 injections d'atoxyl, 4 injections d'émétique et 5 injections de tryparsamide [(4 gr. 75, soit 0 gr. 17 environ par kilogramme).

Mars 1926 : L. C. R., 6 cellules, 0,10 albumine, OT.

Novembre 1926 : L. C. R., 8 cellules, 0,10 albumine, OT.

Les deux autres ont fait des rechutes sanguines. L'un (XXV-47) avait déjà rechuté après une série d'atoxyl. Les trypanosomes n'ont reparu dans le sang que treize mois après un traitement mixte comprenant seulement 4 grammes de tryparsamide. Chez l'autre (C-285) traité uniquement par la tryparsamide, les trypanosomes ont été vus dans la circulation cinq mois après injection de doses assez élevées (3 grammes, en fin

de série). Repris par la tryparsamide, une seconde rechute sanguine s'est produite trois mois et demi plus tard.

XXV-47. — Amandou, reconnu trypanosomé en avril 1925.

L. C. R., 24 cellules, 0,15 albumine, OT.

Reçoit 6 injections d'atoxyl. Un mois plus tard (juin 1925), centrifugation : présence de trypan.

Reçoit alors 4 grammes de tryparsamide, associés à 1 gramme d'atoxyl et à l'émétique.

Septembre 1924. Centrifugation : présence de trypan.

C-285. — Okou Ifou, homme de vingt-cinq ans, poids 55 kilogrammes.

Août 1923 : Ganglions ; présence de trypan ; centrifugation non faite.

L. C. R., 66 cellules, 0,40 albumine, OT.

Reçoit du 3 septembre au 7 octobre 6 injections de tryparsamide graduées de 1 à 3 grammes et formant un total de 12 grammes de produit (0 gr. 2 par kilogramme).

Mars 1926 : centrifugation ; présence de trypan.

L. C. R., 41 cellules, 0,25 albumine, OT.

Deux nouvelles séries sont alors instituées, à un mois d'intervalle, représentant 25 gr. 20 de tryparsamide (0 gr. 45 par kilogramme). Dernière injection le 29 juillet 1926.

27 août : centrifugation, OT.

L. C. R., 7 cellules, 0,10 albumine, OT.

8 octobre : centrifugation, OT.

13 novembre : centrifugation ; présence de trypan.

L. C. R., 1 cellule, 0,20 albumine, OT.

2° SECONDE PÉRIODE CONFIRMÉE.

28 malades de cette catégorie ont pu être suivis.

23 ont présenté pendant plus d'une année toutes les apparences de la guérison.

Chez quelques-uns, revus en brousse au cours d'une tournée, la ponction lombaire de contrôle n'a pu être faite, mais leur état général était excellent. Dans tous les autres cas, la rachicentèse a confirmé le parallélisme entre cette bonne apparence et une formule normale du liquide.

Le tableau ci-contre condense ces résultats favorables. Le nombre de mois indiqué y désigne le temps écoulé depuis la cessation de tout traitement jusqu'à la dernière ponction lombaire.

2 malades améliorés par une première cure ont été ramenés depuis par un second traitement à un état normal. L'un, traité auparavant par l'atoxyl, avait reçu en deux séries 30 gr. 50 de

Deuxième catégorie : Guérisons apparentes.

	LIQUIDE céphalo-rachidien avant traitement	NOMBRE de séries	DOSE totale	DOSE par kilogramme	MOIS d'observations	LIQUIDE céphalo-rachidien après traitement	OBSERVATIONS
A. <i>Ex-atoxylisés</i> :							
XXIV-49.	129, 0,60, OT.	1	7,50	0,16	24	4, 0,20, OT.	
XXV-69.	80, 0,50, T.	2	23,50	0,42	48	6, 0,20, OT.	
XXI-62.	240, 0,90, OT.	3	36	0,69	18	4, 0,20, OT.	Enfant.
XXIV-66.	285, 0,60, OT.	1	6,70	0,20	48	15, 0,25, OT.	
XXIV-99.	280, 0,35, OT.	1	46	0,30	48	2, 0,20, OT.	
XX-69.	700, 0,10, T.	2	34,50	0,58	48	5, 0,15, OT.	
XXII-28.	345, 0,41, OT.	3	33,50	0,52	9	3, 0,20, OT.	Rev. après 17 mois.
XXIV-90.	330, 0,40, OT.	1	25	0,41	17	6, 0,20, OT.	
XX-80.	300, 0,45, OT.	1	42,50	0,35	45	2, 0,45, OT.	
XXIII-66.	205, 0,70, T.	4	26,50	0,82	15	2, 0,20, OT.	
XXIV-128.	355, 0,70, OT.	1	23	0,52	15	8, 0,20, OT.	
XVI-87.	450, 0,10, OT.	2	34,50	0,61	10	4, 0,25, OT.	
XXII-47.	440, 0,40, OT.	2	25	0,41	9	1, 0,10, OT.	
XXIV-177.	360, 0,40, T.	2	22,50	0,43	16	2, 0,20, OT.	Rev. après 14 mois.
C-27.	54, 0,35, OT.	1	14,80	0,32	3	10, 0,10, OT.	Rev. après 13 mois.
C-29.	222, 0,30, OT.	1	3,70	0,17	4	16, 0,45, OT.	
C-4.	440, 0,55, OT.	1	44,0	0,26	19	1, 0,15, OT.	
B. <i>Non atoxylisés</i> :							
XXIV-430.	380, 0,70, T.	2	30	0,50	10	4, 0,10, OT.	Rev. après 14 mois.
XXIV-131.	640, 0,70, T.	2	29,50	0,55	18	2, 0,20, OT.	
XXV-15.	440, 0,45, OT.	2	23,20	0,52	42	4, 0,15, OT.	
C-33.	460, 0,70, OT.	1	3,70	0,49	44	7, 0,20, OT.	Rev. après 15 mois.
S-43.	244, 0,70, T.	1	41	0,25	10	8, 0,25, OT.	
XXV-21.	468, 0,50, OT.	2	34	0,55	7	4, 0,10, OT.	Rev. après 10 mois.

tryparsamide. Il présentait encore au dixième mois une lymphocytose exagérée que la nouvelle cure a fait disparaître, mais en créant une hyperalbuminose passagère.

L'autre, non atoxylisé antérieurement, n'avait reçu qu'une faible série (8 grammes, 0 gr. 13 par kilogramme). Après six mois, le liquide céphalo-rachidien contenait 20 cellules et 0 gr. 50 d'albumine. Une seconde cure l'a ramené à 4 cellules et 0 gr. 20 d'albumine, après une augmentation passagère de la lymphocytose.

3 malades enfin ont rechuté, mais chez tous on peut incriminer soit des traitements atoxyliques antérieurs, soit plutôt le peu d'intensité de la première cure par la tryparsamide.

XVII-39. — Dzamba, reconnu trypanosomé en 1921, et passé en seconde période trois ans plus tard, malgré deux séries d'atoxyl-émétique. La ponction lombaire pratiquée en mai 1924 donne 80 cellules, 0 gr. 25 d'albumine, pas de trypanosomes. Deux nouvelles séries d'atoxyl-émétique sont instituées, puis le malade est mis à la tryparsamide. Il reçoit en décembre 1924 et en avril 1925, deux séries formant un total de 15 grammes (0 gr. 34 par kilogramme). Le liquide céphalo-rachidien, d'abord favorablement influencé (10 cellules, 0 gr. 10 d'albumine, OT après sept mois), montre au dix-neuvième mois une réaction très nette.

Novembre 1926 : L. C. R., 58 cellules, 0,40 albumine, OT.

XXIV-39. — Madede, reconnu trypanosomé en 1924 (L. C. R., 170 cellules, 0,50 albumine, OT). Trois séries d'atoxyl sont absolument inefficaces. En septembre 1925, le L. C. R. contient 160 cellules, 0,70 d'albumine. Trypanosomes. Le malade reçoit alors, faute d'approvisionnement suffisant, 6 gr. 50 de tryparsamide (0 gr. 13 par kilogramme). Trois mois après, en janvier 1926, le L. C. R. est presque normal (20 cellules, 0 gr. 15 d'albumine, OT). Mais au huitième mois, la réaction méningée tend à reprendre son activité.

Juin 1926 : L. C. R., 54 cellules, 0,30 albumine, OT.

Nouvelle série de tryparsamide formant un total de 11 grammes. La sédation est rapide (3 cellules, 0 gr. 20 d'albumine), au bout d'un mois, mais de courte durée, et les altérations du liquide sont, trois mois après cette cure, aussi accentuées qu'auparavant.

Octobre 1926 : L. C. R., 57 cellules, 0 gr. 30 albumine, OT.

Le malade reçoit actuellement une nouvelle série de tryparsamide.

C-239. — N'gualancio, reconnu trypanosomé en août 1925. L. C. R., 230 cellules, 0 gr. 60 albumine, OT). Reçoit 2 injections d'atoxyl et 2 d'émétique, puis 4 injections de tryparsamide. La dose totale de tryparsamide est de 8 grammes, représentant 0 gr. 14 par kilogramme.

Le L. C. R. revient à la normale deux mois après (4 cellules, 0,10 d'albumine) et s'y maintient jusqu'au sixième mois; mais, à la fin du septième, on constate une albuminose légère et une lymphocytose plus accentuée.

Mai 1926. — L. C. R., 69 cellules, 0 gr. 23, albumine, OT.

Deux nouvelles séries, formant un total de 30 grammes de tryparsamide, ramènent au bout de deux mois le L. C. R. à une formule normale.

Octobre 1926 : L. C. R., 14 cellules, 0,25 albumine, OT.

Novembre 1926 : L. C. R., 3 cellules, 0 gr. 20 albumine, OT.

En résumé, sur 28 malades à liquide céphalo-rachidien fortement altéré, mais sans signes cliniques, on trouve :

25 guérisons apparentes, contrôlées pour la plupart par les examens de laboratoire et se maintenant depuis environ seize mois après la cessation de tout traitement ;

2 améliorations :

Pendant six mois avec une dose de 0 gr. 13 par kilogramme.

Pendant dix mois avec une dose de 0 gr. 61 par kilogramme.

3 rechutes survenues :

Sept mois après injection de 8 grammes, soit 0 gr. 14 par kilogramme.

Huit mois après injection de 6 gr. 50, soit 0 gr. 13 par kilogramme.

Dix-huit mois après injection de 15 grammes, soit 0 gr. 34 par kilogramme.

3° PÉRIODE SECONDAIRE AVANCÉE.

Sous cette rubrique, se rangent les malades chez qui les symptômes cliniques traduisent l'altération du système nerveux central. Nous en réunissons 24 cas.

Les guérisons apparentes, au nombre de 13, sont rassemblées dans le tableau ci-après. On peut voir qu'une grande partie d'entre elles concernent des malades atoxylisés auparavant ou traités en association avec l'atoxyl-émétique.

Les accidents oculaires, au nombre de 4, se répartissent également entre les deux catégories de malades ex-atoxylisés et non atoxylisés. Chacune d'elles a présenté un cas d'amblyopie passagère et un cas d'amblyopie permanente très accusée. On peut noter cependant en faveur de la tryparsamide que ces accidents ne sont apparus, chez les sujets traités d'emblée par ce produit, qu'après des doses terminales légèrement plus élevées :

Amblyopie légère :

	TRYPARSAMIDE par kilogramme
Malade ex-atoxylisé	0 gr. 037
Malade non atoxylisé	0 gr. 05

Troisième catégorie : Guérisons apparentes.

	LIQUIDE céphalo-rachidien avant traitement	NOMBRE de séries	DOSE totale	DOSE par kilogramme d'observations	MOIS	LIQUIDE céphalo-rachidien après traitement	OBSERVATIONS
A. Ex-toxyllisés :							
XXIV-73.	Non faite, dément.	1	7	0,13	18	6, 0,30, OT.	Amblyopie, 0,37 par kilogramme. Enfant.
XXIV-134.	Non faite.	1	3,40	0,17	18	2, 0,25, OT.	
XIII-13.	66, 0,40, OT.	1	20,50	0,39	17	2, 0,20, OT.	
XXIV-79.	700, 0,70, T.	3	32,10	0,60	17	6, 0,15, OT.	
XXV-27.	Non faite.	1	19	0,33	12	8, 0,20, OT.	Amblyopie accentuée, 0,045 par kilogramme. Rev. après 14 mois. Rev. après 18 mois.
XIV-45.	300, 0,70, T.	2	33,50	0,55	7	2, 0,10, OT.	
XXIV-144.	290, 0,40, T.	1	9,80	0,20	8	4, 0,10, OT.	
B. Traitement mixte :							
S-40.	1.340, 0,70, OT.	1	4	0,16	13	1, 0,20, OT.	Enfant.
S-41.	950, 0,70, OT.	1	11	0,18	13	1, 0,30, OT.	
C. Non toxyllisés :							
XXV-1.	400, 0,35, OT.	1	15,50	0,32	18	3, 0,20, OT.	Amblyopie accentuée, 0,06 par kilogramme.
XXIV-118.	670, 0,70, T.	1	41,50	0,72	16	2, 0,15, OT.	
S-36.	125, 0,70, OT.	3	9,50	0,17	13	5, 0,20, OT.	Amblyopie, 0,05 par kilogramme.
XXV-92.	330, 0,10, T.	1	6,75	0,22	12	1, 0,15, OT.	

Amblyopie accentuée :

Malade ex-atoxylisé	0 gr. 045
Malade non atoxylisé	0 gr. 06

Deux malades ont été améliorés. L'un, dont le liquide céphalo-rachidien contenait 810 cellules, 0 gr. 70 d'albumine, présentait, quatre mois après une série de 10 grammes de tryparsamide (0 gr. 23 par kilogramme), une légère tendance à une réaction méningée. Deux nouvelles séries de tryparsamide (20 gr. 20) ont ramené à la normale le taux lymphocytaire, mais ont déterminé un léger degré d'hyperalbuminose (4 cellules, 0 gr. 30 albumine).

Le second avait été traité d'emblée par des doses assez fortes de tryparsamide : 32 grammes en deux séries à un mois d'intervalle. De hautes doses terminales (0 gr. 067 par kilogramme, trois fois répétées) ont provoqué une amblyopie passagère. Ramené par ce traitement intensif, dès la fin du troisième mois, à une formule quasi normale, le liquide céphalo-rachidien présentait au bout de dix mois hyperalbuminose légère, le nombre des lymphocytes restant peu élevé. Ce malade a depuis échappé à notre surveillance.

Neuf malades ont rechuté. Deux d'entre eux avaient été traités, faute de tryparsamide en quantité suffisante, par de petites quantités associées à l'atoxyl-émétique ; les sept autres étaient d'anciens malades longuement traités auparavant par l'atoxyl.

Les rechutes se sont produites dans les délais suivants :

a) Traitement mixte :

Quatre mois après injection de 10 gr. 50, soit 0 gr. 25² par kilogramme (enfant).

Treize mois après injection de 13 gr. 75, soit 0 gr. 47 par kilogramme.

b) Malades atoxylisés antérieurement :

Treize mois après injection de 10 gr. 80, soit 0 gr. 29¹ par kilogramme (enfant).

Onze mois après injection de 20 grammes, soit 0 gr. 59 par kilogramme (adolescent).

Neuf mois après injection de 31 gr. 50, soit 0 gr. 56 par kilogramme.

Neuf mois après injection de 19 grammes, soit 0 gr. 47 par kilogramme (enfant).

Huit mois après injection de 9 grammes, soit 0 gr. 12 par kilogramme.

Sept mois après injection de 23 grammes, soit 0 gr. 34 par kilogramme.

Six mois après injection de 20 grammes, soit 0 gr. 33⁴ par kilogramme.

Deux fois les trypanosomes sont réapparus dans le liquide céphalo-rachidien.

Huit de ces malades ont été soumis à un nouveau traitement par la tryparsamide. L'un est mort subitement, un mois après la cure, n'ayant été que faiblement amélioré. Chez les autres, ces reprises ont eu un effet très fâcheux. Dans les cas les plus favorables, l'hyperalbuminose ou l'hyperlymphocytose ont été stimulées; dans les autres, on vit survenir une aggravation de la lésion méningée ou de l'état général telle que l'un des malades succomba. Dans un autre cas enfin, la maladie a poursuivi son évolution fatale.

Le fait nous semble assez important pour que nous résumions, schématiquement ici, ces observations.

XXII-21. — Zakouade, reconnu trypanosomé en 1922, à l'âge de douze ans. Céphalée, somnolence, tremblements généralisés.

1922. Novembre : L. C. R., 940 cellules, présence de trypan.

Reçoit jusqu'en avril 1924 quatre séries de six injections d'atoxyl.

1924. Août : L. C. R., 250 cellules, 0 gr. 70 albumine, OT.

Soumis alors au traitement par la tryparsamide, le malade reçoit :

1924. Septembre-novembre : 6 injections à 0,03 par kilogramme. Total 9 grammes.

1924. Décembre : 3 injections à 0,03 par kilogramme. Total 4 gr. 50.

1925. Avril-mai : 6 injections à 0,045 par kilogramme. Total 11 gr. 50.

Novembre : L. C. R., 30 cellules, 0,20 albumine, OT.

1926. Avril : L. C. R., 68 cellules, 0,40 albumine, OT.

Avril : 6 injections de 0,025 à 0,04 par kilogramme. Total 10 gr. 15.

Juin : L. C. R., 39 cellules, 0,30 albumine, OT.

Juillet : 6 injections de 0,03 à 0,05 par kilogramme. Total 12 gr. 05.

Septembre : L. C. R., 48 cellules, 0,40 albumine, OT.

Septembre-octobre : 6 injections de 0,03 à 0,055 par kilogramme. Total 15 gr. 60.

Novembre : L. C. R., 0,56 albumine, OT.

Décembre : L. C. R., 33 cellules, 0,50 albumine, OT.

XXV-67. — Makalomba, garçon de quinze ans, poids 41 $\frac{3}{4}$ kilogrammes.

1925. Juillet : L. C. R., 510 cellules, 0,70 albumine, OT.

Juillet-octobre : tryparsamide, 10 gr. 50, plus 3 injections atoxyl-émétique.

Décembre : L. C. R., 30 cellules, 0,40 albumine, OT.

1926. Février : L. C. R., 125 cellules, 0,45 albumine, OT.

Février-mars : tryparsamide, 6 injections à 0,04 par kilogramme. Total 9 gr. 60.

Avril : L. C. R., 7 cellules, 0,25 albumine, OT.

Le malade disparaît pendant quatre mois.

Août : L. C. R., 50 cellules, 0,45 albumine, OT.

Août-septembre : tryparsamide, 6 injections à 0,05 par kilogramme. Total 12 gr. 20.

Octobre : L. C. R., 149 cellules, 0,45 albumine, OT.

XXIV-21. — Okie, garçon de douze ans, reconnu trypanosomé en 1924. poids 34 kilogrammes. Mauvais état général, troubles de la marche.

1924. Janvier : L. C. R., 650 cellules, 0,20 albumine. Trypanosomes.

Reçoit dans le courant de l'année 23 injections d'atoxyl qui améliorent l'état clinique, mais sont sans action sur le liquide céphalo-rachidien.

Novembre : L. C. R., 215 cellules, 0,60 albumine, OT.

Décembre : tryparsamide, 4 grammes.

1925. Janvier : L. C. R., 130 cellules, 0,30 albumine, OT.

Avril : tryparsamide, 11 gr. 50.

Juin : L. C. R., 44 cellules, 0,45 albumine, OT.

Septembre : L. C. R., 76 cellules, 0,40 albumine, OT.

Tryparsamide, 3 gr. 50.

Décembre : L. C. R., 55 cellules, 0,40 albumine, OT.

1926. Février : Mauvais état général, tremblements.

Février-mars : tryparsamide, 8 gr. 20.

Mai : L. C. R., 284 cellules, 0,40 albumine, OT.

Mort par accident.

XXIII-40. — Kivouvou, reconnu trypanosomé en 1921, à l'âge de vingt-deux ans. Céphalée, apathie, somnolence. Reçoit en trois ans 33 injections d'atoxyl.

1924. Novembre : L. C. R., 240 cellules, plus de 0,70 albumine, OT.

Novembre-décembre : tryparsamide, 12 grammes.

1925. L. C. R., 92 cellules, 0,50 d'albumine, OT.

Avril-mai : tryparsamide, 19,50. La dernière injection faite à la dose de 3 gr. 50 (0,06 centigrammes par kilogramme) provoque de l'amblyopie.

Juillet : L. C. R., 29 cellules, 0,30 albumine, OT.

1926. Février : L. C. R., 170 cellules, 0,40 albumine. Trypanosomes. La persistance d'un léger degré d'amblyopie fait reprendre à faibles doses le traitement par la tryparsamide.

Février-mars : Tryparsamide, 3 gr. 70.

Avril : L. C. R., 350 cellules, 0,40 albumine, OT.

Mai : tryparsamide, 3 gr. 90.

Juillet : L. C. R., 53 cellules, 0,40 albumine, OT.

Août : L. C. R., 165 cellules, 0,45 albumine, OT.

L'état général devient franchement mauvais. En novembre le malade est impotent et a des émissions involontaires de selles et d'urine.

XXIV-70. — Paiko, reconnue trypanosomée en 1924, poids 64 kilogrammes.

1924. Mars : L. C. R., 2.000 cellules, 0,70 albumine. Trypanosomes.

Reçoit d'abord une longue série d'atoxyl, puis, après rechute sanguine, un traitement au novarsénobenzol.

1925. Avril : incertitude de la marche. Le poids, qui était monté jusqu'à 77 kilogrammes après la cure d'atoxyl, n'est plus que de 70 kilogrammes.

1925. Mai-octobre : tryparsamide, 22 grammes.

Décembre : L. C. R., 70 cellules, 0,20 albumine, OT.

1926. Mars : L. C. R., 440 cellules, 0,40 albumine, OT.

Mars-avril : tryparsamide, 12 gr. 80.

Mai : L. C. R., 45 cellules, 0,35 albumine, OT.

Mai-juin : tryparsamide, 17 gr. 20 (série graduée de 0,025 à 0,04).

Août : L. C. R., 114 cellules, 0,35 albumine, OT.

Août-septembre : tryparsamide, 16 gr. 50 (de 0,03 à 0,05 par kilogramme).

4 novembre : L. C. R., 190 cellules, 0,40 albumine, OT.

L'état général devient mauvais. L'amaigrissement est de 9 kilogrammes : pas de diarrhée, mais vomissements.

A la fin du mois de novembre, une légère amélioration se dessine.

XXV-98. — Mamadou, homme de quarante-cinq ans, d'aspect robuste (poids 75 kilogrammes).

Reconnu trypanosomé en 1923. Céphalée, asthénie, somnolence. Reçoit dans le courant de 1923 un traitement par l'atoxyl.

1925. septembre : L. C. R., 200 cellules, 0,70 albumine. Trypanosomes.

Septembre-octobre : tryparsamide, 1 gr. 50, 2 grammes, 2 gr. 50, 3 grammes. Total 9 grammes.

Novembre : L. C. R., 70 cellules, 0,50 albumine, OT.

1926. Avril : L. C. R., 20 cellules, 0,40 albumine, OT.

Juin : L. C. R., 29 cellules, 0,40 albumine.

L'état général est très bon ; le poids a augmenté de 11 kilogrammes (86 kilogrammes).

Pour consolider une guérison qui semble hésitante, on fait au mois d'août une nouvelle cure de tryparsamide aux doses de 1 gr. 70, 2 gr. 20, 3 grammes, 3 gr. 40, 3 gr. 50. En septembre le facies est hébété, des tremblements légers apparaissent qui s'accroissent dans les jours suivants, la marche devient difficile, la somnolence reparait. Le poids, qui s'était maintenu au-dessus de 84 kilogrammes pendant le traitement, subit à l'apparition de ces symptômes une chute considérable. Le 1^{er} octobre, il n'est plus que de 68 kilogrammes. Pourtant la ponction lombaire ne décèle pas la réaction méningée que les signes cliniques laissaient prévoir : L'albuminose a bien subi une légère augmentation, mais le nombre de lymphocytes par millimètre cube a diminué.

1926. Octobre : L. C. R., 13 cellules, 0,45 albumine, OT.

Seconde série de tryparsamide formant un total de 13 gr. 10 et appliquée par doses croissantes de 0,03 à 0,05 par kilogramme. Cette dernière dose provoque de l'amaurose du côté droit et une légère amblyopie à gauche.

Quinze jours après la fin de cette cure, le liquide céphalo-rachidien est amélioré.

19 novembre : L. C. R., 11 cellules, 0,40 albumine, OT.

Mais l'état clinique a franchement empiré. L'amaigrissement continue, le poids n'est plus que de 63 kilogrammes. La marche est devenue très pénible, il y a de l'insomnie nocturne, un peu d'excitation et même, semble-t-il, de légers troubles mentaux.

Le 24 novembre les troubles mentaux sont évidents, le malade est excité et déchire ses vêtements. L'état général s'altère de plus en plus, le poids tombe à 59 kilogrammes, la marche devient impossible, le malade s'alite, ne mange plus, tombe en hyperthermie et meurt le 2 décembre.

XXIV-4 bis. — Bokaka, fillette de douze ans, reconnue trypanosomée en octobre 1924 et soignée à l'atoxyl. Poids 22 kilogrammes.

1925. Avril : L. C. R., 130 cellules, 0,25 albumine. Trypanosomes.

Avril-mai : tryparsamide, 5 gr. 80.

Juin : tryparsamide, 5 grammes.

Décembre : L. C. R., 20 cellules, 0,10 albumine, OT.

L'enfant va habiter avec ses parents à Mossaka, elle nous est ramenée huit mois après ce traitement atteinte de tremblements violents et de somnolence.

accentuée. Le liquide céphalo-rachidien contient des trypanosomes, pourtant l'état général est assez bien conservé.

1926. Août : L. C. R., 230 cellules, 0,75 albumine. Trypanosomes.

On administre 3 gr. 40 de tryparsamide en 4 injections graduées de 0,02 à 0,045 par kilogramme. Après la quatrième injection, la malade, qui était restée chez ses parents, cesse d'être présentée à la visite et nous apprenons son décès quelques semaines plus tard.

Voici donc sept malades chez qui l'on constate, après reprise du traitement :

Trois fois une réaction méningée sans signes cliniques.

Trois fois une réaction méningée avec apparition de symptômes et altération de l'état général si graves que la mort est déjà survenue dans un cas et qu'il y a dans un autre peu d'espoir de voir survivre le malade.

Une fois, une absence d'action sur une évolution morbide apparue spontanément et terminée rapidement par la mort.

Faut-il faire intervenir, pour expliquer ces faits, la quantité de médicament administrée?

On pourrait voir à la rigueur dans l'observation XXIII-40 un exemple de l'effet fâcheux des faibles doses qu'imposa dans ce cas une première atteinte d'amblyopie.

A l'inverse, dans l'observation XXV-98, on pourrait incriminer des doses élevées, bien que, chez ce malade robuste et en très bon état clinique au moment où fut repris le traitement, une dose de 5 gr. 50 ne correspondait en réalité qu'à 0 gr. 045 par kilogramme.

Mais chez les autres (sauf XXVI-4 bis, en raison de l'âge de la malade), les doses maxima oscillent aux environs de 2 gr. 50.

Est-ce impuissance de la tryparsamide à enrayer l'évolution morbide? On pourrait l'admettre d'après l'observation de Boyaka et celle qui sera donnée plus loin de Kaladike.

Mais celle de Mamadou montre au contraire l'apparition de symptômes cliniques inexistantes auparavant, en particulier de troubles mentaux. De même, dans les autres cas, l'altération de l'état général, l'augmentation tantôt de la lymphocytose, tantôt de l'albuminose à mesure que se succèdent les séries, sont plutôt en faveur d'une action toxique.

Le même phénomène, moins accusé, se retrouve dans les observations des malades améliorés de la deuxième et de la troisième-catégorie.

Les doses injectées n'ayant rien d'exagéré, nous serions tenté d'admettre que, chez ces malades, une première cure de tryparsamide détermine une sensibilisation de l'organisme qui le rend ultérieurement moins apte à bénéficier des effets curatifs du médicament qu'à ressentir les effets toxiques sur les centres nerveux qu'il a de commun avec les autres arsenicaux.

Pour résumer :

Sur 24 malades présentant des symptômes cliniques d'envahissement du système nerveux, on trouve :

13 guérisons apparentes suivies pendant seize mois environ ; parmi elles, deux amblyopies persistant après douze et dix-huit mois ;

2 améliorations dont une présente une recrudescence de l'hyperalbuminose après reprise par la tryparsamide ;

9 rechutes sur lesquelles sept soumises à un nouveau traitement ont vu apparaître ou continuer à évoluer des manifestations morbides qui, dans deux cas, ont eu déjà une issue fatale.

4° PÉRIODE TERMINALE DE LA MALADIE DU SOMMEIL.

Chez ces malades voués selon toute apparence à une mort prochaine lorsque fut entrepris le traitement, les résultats sont excellents. Nous trouvons six succès, une amélioration et un décès.

Parmi les succès, l'un concerne un malade traité uniquement par la tryparsamide, un autre en association avec l'émétique et le 309 Fourneau.

Les quatre autres concernent d'anciens malades atoxylisés auparavant. De ces derniers, l'un (observation citée dans le mémoire de Laigret XX-64) est mort d'une affection intercurrente onze mois après la cessation du traitement et en très bon état au point de vue du liquide ; les trois autres présentent aux dix-septième et au dix-neuvième mois un liquide céphalo-rachidien normal.

Parmi eux on trouve deux amauroses, provoquées par des doses de 0 centigr. 06 par kilogramme, alors que le malade traité d'emblée à la tryparsamide a pu supporter sans dommage des doses de 0 centigr. 07 par kilogramme plusieurs fois répé-

tées. Cette unique série l'a ramené à un état normal qui se maintient depuis plus de seize mois. C'est là un exemple heureux de l'efficacité des fortes doses, exemple qu'il serait sans doute dangereux d'ériger en règle chez les malades de cette période, mais qui mérite d'être cité.

Nous compléterons donc l'observation déjà rapportée en partie par Laigret.

XXV-19. — Mavoua, état très mauvais, alternance de crises de somnolence et de crises furieuses.

L. C. R., 290 cellules, trypanosomes.

Reçoit du 29 avril au 19 juin 1925, 8 injections de tryparsamide graduées de 1 gr. 50 à 3 gr. 50, et dont les trois dernières correspondent à 0 centigr. 07 de produit par kilogramme. Au total 22 grammes de tryparsamide (0,45 par kilogramme).

Disparition des troubles mentaux, plus de somnolence, état général très amélioré, pas de troubles oculaires.

1925. Juillet : L. C. R., 30 cellules, 0,25 albumine, OT.

1926. Janvier : L. C. R., 5 cellules, 0,20 albumine, OT.

La malade est en parfait état. Il est autorisé à habiter un village voisin sous condition de venir se faire examiner régulièrement.

1926. Avril : L. C. R., 2 cellules, 0,20 albumine, OT.

Octobre : L. C. R., 5 cellules, 0,20 albumine, OT.

Voici, d'autre part, un succès non moins brillant dû à un traitement mixte :

XXV-75. — Poutou, femme de vingt-cinq ans, entre au Lazaret en très mauvais état, impotence, facies hébété. Les ganglions contiennent des trypanosomes. La ponction lombaire n'a pas été faite.

Reçoit le 21 juillet 1925, émétique et 309 Fourneau en injection intraveineuse et 0 gr. 50 de tryparsamide en injection intramusculaire. Huit jours après la malade commence à parler, le facies devient meilleur.

Après deux injections semblables (sauf élévation à 1 gramme de la dose de tryparsamide), l'amélioration est très nette, la malade peut marcher.

En septembre elle reçoit une série de six injections de tryparsamide allant de 1 gramme à 2 gr. 50, au total 10 gr. 50 (0 gr. 29 par kilogramme). Un mois après, l'amélioration est telle que la malade peut aller habiter au village. Le liquide céphalo-rachidien donne 2 cellules et 15 centigrammes d'albumine.

Depuis cette époque la guérison s'est maintenue; la malade mène une vie normale, elle est même actuellement enceinte de six mois. La centrifugation reste négative et le liquide céphalo-rachidien normal.

1926, novembre : L. C. R., 6 cellules, 0,15 albumine.

Dans un cas, l'amélioration a été considérable puisque la survie, que l'on n'estimait pas à plus de trois semaines lorsque le traitement fut institué, dépasse aujourd'hui vingt-six mois.

La malade, il est vrai, a été soumise à un nouveau traitement

par la tryparsamide en raison d'un amaigrissement continu et du retour des altérations du liquide onze mois après le premier traitement.

Elle ne semble avoir retiré de cette seconde cure qu'un bénéfice incertain et son avenir reste sombre. La première partie de son observation a été donnée par Laigret; nous n'y reviendrons pas ici, nous contentant de rappeler que trois séries de tryparsamide avaient ramené le liquide céphalo-rachidien à une formule très voisine de la normale.

XXIV-29. — Koualada.

1925. Juillet : L. C. R., 25 cellules, 0,20 albumine, OT.

De juillet à novembre 1925, l'état général se maintient excellent; le poids reste aux environs de 54 kilos; une ponction lombaire montre que la formule du liquide est stationnaire.

Septembre : L. C. R., 24 cellules, 0,40 albumine, OT.

A partir de novembre, le poids baisse graduellement; il n'est plus que de 50 kilos à la fin de décembre et une légère réaction méningée se dessine.

Décembre : L. C. R., 70 cellules, 0,20 albumine, OT.

Dans les mois suivants, la rechute s'accroît. En mars 1926, le poids n'est plus que de 46 kilogrammes; quelques jours après, la ponction lombaire donne :

1926. Avril : L. C. R., 150 cellules, 0,40 albumine, OT.

La malade reçoit alors une nouvelle série de tryparsamide, graduée de 1 à 2 grammes, au total 8 gr. 80. Le poids se maintient, la lymphocytose diminue, mais l'hyperalbuminose rachidienne n'est pas influencée.

Juin : L. C. R., 32 cellules, 0,40 albumine, OT.

Seconde série de 6 injections ne dépassant pas 2 grammes, au total 10 gr. 80; le poids baisse de 5 kilogrammes; la ponction lombaire donne :

Août : L. C. R., 32 cellules, 0,20 albumine, OT.

Troisième série de 7 injections à 1 gr. 50; total, 10 gr. 50. Au cours de cette série, le poids baisse encore de 3 kilogrammes (38 kilogrammes). Après un mois de repos, il n'est plus que de 37 kilogrammes et la ponction lombaire montre une recrudescence de la réaction méningée.

Novembre : L. C. R., 70 cellules, 0,40 albumine, OT.

L'état général est des plus médiocres; pourtant, on ne constate aucun symptôme clinique.

Dans le dernier cas, enfin, le malade a succombé après une survie de près de deux ans. L'observation en a été également donnée par Laigret. Nous n'en rappellerons que l'essentiel.

XXIV-59. — Kaladike, très mauvais état général, troubles de l'équilibre, tics de la face.

Après neuf mois d'observation (trois mois après la fin du traitement représentant un total de 42 gr. 60 de tryparsamide, répartis en trois séries), le malade était en voie de rechute.

1925. Août : L. C. R., 84 cellules, 0,60 albumine, OT.

Une quatrième série qui ne put, par pénurie de l'approvisionnement, dépasser 7 grammes, donna un bon résultat immédiat.

Novembre : L. C. R., 40 cellules, 15 centigrammes albumine, OT.

Le poids était de 53 kilogrammes, le malade se déclarait en bon état, mais cette accalmie ne fut que de courte durée. Un amaigrissement de 6 kilogrammes survint rapidement et la ponction lombaire donna :

1926. Février : L. C. R., 223 cellules, 0,70 albumine, OT.

En février-mars, on pratique 6 nouvelles injections de tryparsamide formant un total de 9 gr. 80. L'état général continue de s'altérer.

Le poids baisse régulièrement. Malgré deux mois de repos, il n'est plus au mois de mai que de 43 kilogrammes. La ponction lombaire indique une altération parallèle du liquide céphalo-rachidien.

Mai : L. C. R., 284 cellules, 0,65 albumine, OT.

En juin, nouvelle série de tryparsamide (9 gr. 60). Le malade périlite ; le poids qui était resté à 43 kilogrammes pendant la dernière série tombe, un mois après, à 37 kilogrammes. Des tremblements apparaissent, la marche devient impossible et le malade meurt au mois d'août, après avoir présenté une violente réaction méningée.

Août : L. C. R., 1.450 cellules, plus de 1 gramme albumine, OT.

La récapitulation des chiffres donnés dans les pages précédentes nous conduit aux résultats globaux suivants :

CATÉGORIES	NOMBRE de malades	SUCÈS	AMÉLIORATIONS	RECUITES	ACCIDENTS oculaires de longue durée	DÉCÈS
1.	4	2		2		
2.	28	23	2	3		
3.	24	11	2	7	2	2
4.	8	4	1		2	1
<i>Totaux</i>	64	40	5	12	4	3
<i>Pourcentage</i>		62,5	8,3	18,7	6,6	5

Le nombre élevé des succès, déjà éloquent par lui-même, prend encore plus de valeur si l'on considère les doses avec lesquelles ils ont été obtenus.

Un seul des malades qui figurent sur nos tableaux a reçu une dose supérieure à 40 grammes. Beaucoup d'autres restent très au-dessous, si bien que la dose moyenne administrée aux adultes est de :

22 grammes environ pour les malades de la deuxième catégorie ;

19 grammes environ pour les malades de la troisième catégorie ;

24 grammes environ pour les malades de la quatrième catégorie.

Si, pour plus de précision, nous ramenons, en tenant compte du nombre de séries, la quantité de tryparsamide injectée à la dose totale par kilogramme, nous voyons que ces succès ont été obtenus :

1° Chez les malades des première et deuxième catégories (deuxième période sans signes cliniques) :

11 fois après une série. Doses extrêmes 0,46 et 0,52 par kilogramme, dose moyenne 0,30 (1).

11 fois après deux séries. Doses extrêmes 0,34 et 0,61 par kilogramme, dose moyenne 0,35.

1 fois après trois séries. Dose 0,70.

7 fois le liquide céphalo-rachidien contenait des trypanosomes.

2° Chez les malades des troisième et quatrième catégories (deuxième période avec signes cliniques) :

15 fois après une série. Doses extrêmes 0,43 et 0,64 par kilogramme, dose moyenne 0,35.

1 fois après deux séries. Doses extrêmes 0,58 et 0,72 par kilogramme, dose moyenne 0,60.

5 fois le liquide céphalo-rachidien contenait des trypanosomes.

La moyenne de ces doses (0 gr. 51), rapportée à un indigène du poids ordinaire de 50 kilogrammes, représente donc une cure de tryparsamide d'environ 25 grammes.

La plupart de ces sujets étaient d'anciens trypanosomés traités antérieurement par une ou plusieurs séries d'atoxyl.

En première catégorie, sur 2 succès il y a 1 ex-atoxylisé ;

En deuxième catégorie, sur 23 succès il y a 17 ex-atoxylisés ;

En troisième catégorie, sur 13 succès il y a 7 ex-atoxylisés ;

En quatrième catégorie, sur 6 succès il y a 4 ex-atoxylisés.

Le traitement mixte a donné autant de succès que de rechutes :

Première catégorie : 1 succès, 1 rechute.

Deuxième catégorie : 1 rechute.

Troisième catégorie : 2 succès, 2 rechutes.

Quatrième catégorie : 1 succès.

Il ne semble donc pas, et c'est également l'avis de Jamot (2),

(1) Cette moyenne n'est pas calculée d'après les doses extrêmes, mais d'après la quantité de médicament effectivement reçue par chaque malade.

(2) E. JAMOT, Au sujet du traitement prophylactique de la maladie du sommeil. *Bull. Soc. Path. exot.*, 9 juin 1926, p. 471.

qu'un traitement atoxylique antérieur ait sur l'action de la tryparsamide l'influence fâcheuse qu'on a cru pouvoir lui attribuer. Il n'y a pas de ce fait apparition d'arséno-résistance, comme le prouvent les cas où les trypanosomes, réapparus dans le liquide céphalo-rachidien après traitement par l'atoxyl, ont disparu sous l'influence de doses parfois faibles de tryparsamide (observation XXIV-144).

On ne peut pas non plus lui attribuer une action trop considérable dans la production des accidents oculaires. Cette action est réelle, certes, puisqu'ils apparaissent, ainsi que nous l'avons déjà noté, avec des doses de tryparsamide plus faibles chez des malades atoxylisés que chez les non-atoxylisés. La différence est de l'ordre de 1 centigramme 1/2 par kilogramme et il est bon d'en tenir compte dans la direction du traitement.

Mais nous avons vu aussi que, chez les malades de la troisième catégorie, les amblyopies se répartissaient également entre les non-atoxylisés et les ex-atoxylisés. Or, ces derniers sont deux fois plus nombreux : 7 contre 4, et même 9 contre 4, en comptant les sujets soumis à un traitement mixte.

Assurément, ces chiffres sont trop faibles pour permettre des déductions certaines. Bornons-nous à reconnaître que le danger existe et que pour l'éviter il sera prudent de rester en deçà des doses de 0,055 par kilogramme chez les individus non atoxylisés et de 0,04 centigr. chez les sujets antérieurement atoxylisés.

Les rechutes revêtent deux modalités, selon le degré d'évolution de la maladie.

Au début de la seconde période, elles affectent uniquement le système circulatoire, la réaction méningée paraissant complètement éteinte.

Ici encore, on peut noter que l'arséno-résistance créée par un traitement atoxylique est négligeable, puisque (observation XXV-47) les trypanosomes n'ont reparu que treize mois après injection de 4 grammes de tryparsamide associée à l'atoxyl-émétique, au lieu d'un mois après le seul traitement atoxylique.

Au contraire, l'arséno-résistance que provoque une première série inefficace de tryparsamide est des plus nettes. Dans l'observation C-28, on voit la seconde rechute se produire dans un

temps plus court de moitié, malgré l'administration d'une dose double de tryparsamide.

Aux stades confirmés et avancés de la seconde période, ce sont l'hyperlymphocytose et l'hyperalbuminose qui se reproduisent. Les trypanosomes reparaissent quelquefois dans le liquide céphalo-rachidien (2 fois sur 13), jamais dans la circulation périphérique.

Nous avons déjà indiqué les délais au cours desquels ces rechutes se sont produites. Voici, pour permettre la comparaison avec les guérisons, un tableau récapitulatif par séries et par doses :

1° Malades de la deuxième catégorie (sans signes cliniques) :

1 rechute après 1 série, dose 0,14 centigrammes par kilogramme.

2 rechutes après 2 séries, doses extrêmes 0,13 et 0,34 par kilogramme, dose moyenne 0,23.

2° Malades des troisième et quatrième catégories (avec signes cliniques) :

4 rechutes après 1 série, doses extrêmes 0,12 à 0,34, dose moyenne 0,21.

2 rechutes après 2 séries, doses extrêmes 0,29 à 0,33, dose moyenne 0,31.

1 rechute après 3 séries, dose 0,54.

1 rechute après 4 séries, dose 0,40.

Il ressort nettement de cette comparaison que les échecs sont imputables à l'insuffisance des traitements.

La moyenne des doses administrées par kilogramme ne représente, en effet, que 0,30 centigrammes, ce qui, rapporté comme précédemment à un indigène pesant 50 kilogrammes, donne seulement une cure de 15 grammes de tryparsamide.

Le gros écueil de ces rechutes — au moins dans les formes avancées — est, nous semble-t-il, le coup de fouet que les reprises de traitement donnent le plus souvent à l'évolution de la maladie.

On ne peut guère compter à ce moment ramener le liquide céphalo-rachidien à une formule normale. Si une première série semble avoir un effet favorable, cet effet n'est que passager. Si on multiplie les séries, si on augmente les doses, on s'expose à plus de méfaits que de bienfaits.

Pour être efficace, le traitement par la tryparsamide doit

donc être porté d'emblée au maximum de tolérance individuelle. Faible ou forte, une médication tardive, après rechute, est souvent plus nuisible qu'utile.

CONCLUSIONS.

Le traitement de la seconde période de la maladie du sommeil par la tryparsamide donne un pourcentage de guérisons apparentes très élevé : 62,5 p. 100 chez des malades restés sans aucune médication pendant une période variant de neuf à vingt-quatre mois.

Ces succès ont été obtenus avec des doses relativement faibles (25 grammes environ de tryparsamide pour un adulte de 50 kilogrammes).

Un traitement atoxylique antérieur ne gêne pas l'action de la tryparsamide. L'arséno-résistance créée par elle est peu marquée. Au contraire, une cure inefficace de tryparsamide provoque une arséno-résistance très nette.

Dans quelques cas, de bons effets ont été obtenus avec un traitement mixte.

Au point de vue des accidents oculaires, l'action de l'atoxyl se traduit par une sensibilité plus grande à la tryparsamide (différence de 0,015 centigrammes par kilogramme). Dans l'ensemble, leur fréquence n'est pas plus grande chez les malades atoxylisés que chez ceux traités uniquement par la tryparsamide.

Les rechutes (18,7 p. 100) sont en général imputables à une insuffisance de traitement. A l'occasion d'une nouvelle cure, elles donnent lieu très souvent dans les formes avancées, et probablement sous l'influence d'une sensibilisation de l'organisme, à une aggravation de l'état méningé et de l'état général qui paraît être d'origine toxique.

NOUVELLE ENQUÊTE
SUR LA RÉPARTITION DU BOUTON D'ORIENT
EN GRÈCE. UN FOYER CONTINENTAL
EN LACONIE-PÉLOPONÈSE

par GEORGES BLANC et J. CAMINOPETROS.

En 1909, Cardamatis décrivit les premiers cas de Bouton d'Orient observés en Grèce [1]. Ces cas provenaient de Héracleion (Candie) en Crète. Le même auteur, en collaboration avec Melissidis, fit connaître, en 1911 [2], de nouveaux cas crétois provenant de Pera et Zarkou, dans la province de Malevysion, où la maladie paraissait fréquente. En 1920 Photinos [3] signale que lui et ses élèves ont traité par les injections d'émétine 23 cas, tous provenant de Crète. Nous-mêmes, en 1920 [4], au cours d'un voyage d'étude en Crète, observons 20 cas de Bouton d'Orient à la Canée et un assez grand nombre à Héracleion (Candie) et dans la province de Malevysion.

Dans cette même province, nous refaisons les mêmes constatations, en 1923 au cours d'un nouveau voyage d'études entrepris avec le Dr Langeron [5]. Ajoutons que les médecins qui exercent en Crète connaissent bien la maladie (que le peuple appelle Chaniotiko, c'est-à-dire bouton de la Canée) et sont d'accord pour admettre que c'est une affection endémique sur la côte nord de l'île avec trois foyers principaux qui sont les trois villes de la Canée, Retymo et Candie. De ces trois centres le Bouton d'Orient s'étend aux villages de la périphérie dans un rayon de dix à quinze kilomètres. Mais, tandis que ces trois centres sont infectés en permanence, les villages des environs n'ont que des cas sporadiques et intermittents (1). Sur la côte Sud et dans la région de l'Est (région de Sitia), on n'observe pas

(1) Cette règle n'est pas absolue, car certains villages sont aussi ou même plus profondément infectés que les villes. C'est ainsi que tout récemment, à Melidoni, village du département de Retymno (Crète), la presque totalité des habitants avaient des boutons d'Orient.

de Boutons d'Orient, sauf accidentellement. Il s'agit alors de cas contractés dans les régions d'endémicité indiquées plus haut.

A l'exception de la Crète y a-t-il en Grèce d'autres foyers de Bouton d'Orient? Si l'on s'en rapporte aux travaux publiés ou aux renseignements oraux, on est porté à croire que la *Leishmaniose cutanée* n'existe en Grèce continentale qu'à l'état sporadique, sans qu'il soit possible d'affirmer que les boutons observés sont vraiment autochtones et qu'ils ne sont pas simplement contractés au contact de boutons de provenance étrangère, de Crète ou d'Asie Mineure.

Pour répondre à cette question et préciser nos connaissances sur la répartition du Bouton d'Orient en Grèce, nous avons fait une enquête dans les lieux où nous pouvions soupçonner l'existence de cas autochtones.

Ce sont les résultats fournis par cette enquête que nous donnerons dans la présente étude, après avoir indiqué les documents antérieurs à nos recherches que nous avons pu recueillir.

A. — Documents sur l'existence du Bouton d'Orient dans la Grèce continentale recueillis avant notre enquête.

Dans la littérature, nous n'avons trouvé que l'observation publiée par Heuyer en 1919 [6]. Il s'agit d'un soldat examiné par l'auteur à Koritza d'Albanie. Les boutons siégeaient à la partie supéro-externe de la paupière droite, et à la partie supérieure du lobule de l'oreille droite, ils étaient apparus alors que le soldat était au front devant Monastir (1917). Le bouton de l'oreille n'ayant fait son apparition qu'un mois après celui de la paupière. Il n'est pas possible d'affirmer que c'est à Monastir même que le bouton avait été contracté, car avant d'être en lignes à Monastir, le soldat russe avait séjourné en Macédoine dans une région qui n'a pas été précisée (1).

Plus nombreux ont été les cas que nous avons pu relever dans les archives conservées à l'hôpital Syngros, à Athènes, grâce à l'amabilité du professeur Photinos et à la complaisance de ses assistants, en particulier de M. Andréadis.

(1) Renseignements aimablement communiqués par Heuyer.

De 1915 à 1926, 60 cas de Boutons d'Orient ont été soignés à cet hôpital, dont 43 provenant de Crète ou, après le désastre micrasiatique, d'Asie Mineure et particulièrement de la région du Pont et 17 soit des îles autres que la Crète, soit de Grèce continentale. Seuls nous intéressent ces 17 cas dont nous donnons brièvement l'observation.

1916. Un cas.

Bouton de l'avant-bras, datant de six mois, sur un homme de trente ans, né à Syphnos (Cyclades), mais habitant à Athènes.

1920. Deux cas.

1. Bouton de la face, datant de quatre mois, sur une femme de vingt et un ans, *née et habitant à Cythère*.

2. Bouton de la face, datant d'un an, sur une fillette de neuf ans, née à Zante et habitant à Athènes.

1921. Un cas.

Boutons siégeant à la face, sur une fillette de neuf ans, née à Athènes et y habitant, mais apparus alors que l'enfant était à Calamata (Messénie).

1922. Trois cas.

1. Boutons à la face, apparus depuis huit mois sur un jeune homme de dix-sept ans, *né et habitant au Laurium* (Attique).

2. Bouton à la face, datant de un mois et demi, sur un garçon de douze ans, né et habitant à Athènes.

3. Boutons à la face, datant de deux mois et demi, sur un homme de soixante-dix-huit ans, né à Andros et habitant à Athènes.

1923. Six cas.

1. Boutons de la face, datant de deux ans, sur une fillette de cinq ans, *née et habitant à Cythère*.

2. Bouton de la face, datant de sept mois, sur une femme de vingt-six ans, née à Cythère et habitant à Athènes.

3. Bouton de la face, datant de un an, sur une fillette de cinq ans, née à Athènes et y habitant.

4. Bouton de la face, datant de six mois, sur un jeune homme de vingt-trois ans, né à Corfou et habitant à Athènes.

5. Bouton de la face, datant de quatre mois, sur un jeune homme de vingt-deux ans, né au Pirée et habitant à Larissa (Thessalie), c'est à Larissa qu'est apparu le bouton.

6. Boutons de la face et des mains, datant de un an, sur une fillette de huit ans, née à Volo et y habitant.

1924. Un cas.

Bouton de la face, datant de six mois, sur un jeune homme de seize ans, né et habitant à Athènes.

1925. Deux cas.

1. Boutons de la face, datant de un an, sur une fillette de cinq ans, née et habitant à Calymno (île du Dodécanèse).

2. Boutons de la face, datant de huit mois, sur une femme de quarante ans, née et habitant à Néapolis (Laconie).

1926. Un cas.

Boutons de la face, datant de sept mois, sur un jeune homme de dix-neuf ans, né à Kythnos (Cyclades) et habitant à Athènes.

Ces 17 cas que nous venons de passer en revue ne présentent pas pour nous un intérêt de valeur égale. Tous ceux observés sur des personnes habitant à Athènes ne peuvent pas nous renseigner sur l'existence d'un foyer continental de Bouton d'Orient car, faute de renseignements, nous ignorons s'ils ont été contractés à Athènes même, ou si, comme c'est le cas le plus fréquent, ils ont été contractés dans des foyers extérieurs tels que la Crète. En voici un exemple typique : Une jeune fille de quatorze ans, née et habitant à Athènes, se présente à nous porteuse de trois boutons, l'un au visage et les deux autres sur l'un des bras. En l'interrogeant, nous apprenons qu'elle est allée en Crète, au cours de l'été précédent, passer plusieurs semaines dans un village des environs de Candie. Dans la maison se trouvait son cousin, enfant d'une douzaine d'années, qui partageait sa chambre et était lui-même porteur de plusieurs boutons à la figure. Il est évident que, bien que les boutons soient apparus à Athènes, nous avons affaire à un cas de Bouton d'Orient d'origine crétoise.

Beaucoup plus intéressants sont les cas contractés sans doute possible loin d'Athènes et loin de tous foyers étrangers.

Nous en relevons 8 : 1 du Laurium, 1 de Calamata, 2 de Cythère, 1 de Larissa, 1 de Volo, un de Calymno et 1 de Néapolis.

En se basant sur ces données peu nombreuses, mais précises, on peut conclure qu'en dehors de la Crète et, semble-t-il, à l'abri de toute contamination étrangère, on peut observer çà et là en Grèce des cas de Boutons d'Orient. Nous avons tenu à savoir si ces cas peu fréquents sont de ces cas dits « ectopiques », se produisant en des régions normalement indemnes, ou s'ils ne représentent que des cas arrivés par hasard à la connaissance médicale, mais provenant de foyers véritables. L'observation

détaillée d'un de ces cas nous a incités à entreprendre une enquête sur place, au lieu d'origine. Nous avons pu recueillir quelques observations qui nous paraissent intéressantes et que nous présenterons brièvement.

B. — Documents épidémiologiques
recueillis au cours d'une enquête dans la région
de Néapolis de Laconie.

A. — DESCRIPTION DU PREMIER CAS DE BOUTON D'ORIENT
PROVENANT DE NÉAPOLI.

Le 12 janvier 1926 nous est adressée, de l'hôpital Syngros, une malade qui porte au visage deux boutons d'Orient. C'est une femme de quarante ans, originaire de Néapolis de Laconie où elle résidait avant de venir à Athènes, et qu'elle a toujours habitée. D'après ses dires, les médecins qu'elle a consultés pour sa maladie auraient porté le diagnostic de Lupus et lui auraient conseillé d'aller à Athènes suivre un traitement radiothérapique. Elle se rend donc à Athènes et va à la consultation externe de l'hôpital Evangelismos où le diagnostic de Bouton d'Orient est porté. De là on l'adresse alors à l'hôpital Syngros pour y suivre le traitement au chlorhydrate d'émétine du professeur Photinos. Elle y reçoit deux injections, à six jours d'intervalle, dans chaque bouton. A la suite de la seconde piqûre, le bouton supérieur présente une forte réaction inflammatoire qui disparaît en huit jours. La malade effrayée cesse le traitement. C'est à ce moment que nous la voyons. Elle porte à la joue gauche deux gros boutons. L'un siège un peu au-dessous de la paupière inférieure, couvrant la région malaire. Il est assez régulièrement arrondi, son diamètre est d'environ deux centimètres. Le centre, ulcéré, est recouvert d'une croûte noirâtre; çà et là, entre le bord de l'ulcère et la croûte, font saillie des bourrelets d'un blanc jaunâtre qui indiquent la présence de pus. Le second bouton, plus petit, siège à la région massétérienne, à la hauteur de la commissure gauche des lèvres. A son centre existe une croûte sèche. Il n'y a pas de pus. L'examen microscopique des deux boutons nous révèle la présence de très nombreuses *Leishmania* et des cultures en milieu N. N. N. poussent abondamment en six jours.

D'après la malade, l'apparition du bouton remonterait aux fêtes de Pâques de l'année précédente, soit à environ dix mois.

Nous nous trouvons en présence d'un cas qui, à n'en pas douter, est bien originaire de la Grèce continentale. Il reste à savoir s'il n'a pas été contracté au contact de réfugiés d'Asie Mineure, eux-mêmes infectés de Bouton d'Orient et, dans la négative, si nous avons affaire à un cas ectopique ou s'il existe dans la région de Néapolis un foyer méconnu de *Leishmaniose*.

cutanée. Pour résoudre la question, nous nous rendons au mois d'avril 1925 à Néapolis.

B. — NÉAPOLIS DE LACONIE ET SES ENVIRONS.

Néapolis est un petit port qui s'ouvre à la pointe sud-est de la Laconie dans la baie de Vatika. Cette baie forme un arc profond limité à l'ouest par l'île Elaphonisie, au nord par les monts Aliki et les Aspra Vouna et, à l'est, par une longue crête montagneuse qui descend jusqu'au cap Malée. L'horizon est borné de toutes parts et, en pénétrant dans la baie, on a l'impression d'arriver en un lieu isolé du reste du continent, où s'étage Néapolis au bord de la mer et quelques villages dans la montagne. De fait, seul un mauvais sentier de montagne relie Néapolis à Monemvasie situé plus au nord et où vient aboutir la route de Sparte. Toutes les communications de Néapolis avec le reste de la Grèce se font par mer.

La ville est à l'extrémité sud d'une plaine de poros néogène (Pliocène) où abondent les coquilles marines (huîtres et Pecten) en bon état de conservation. Cette plaine s'étale entre les monts Aliki à l'ouest, les Aspra Vouna au nord, et les crêtes de Mesochori et de Pharaklo à l'est. Elle est médiocrement fertile, surtout à la partie profonde où le poros s'effrite en un sable rouge. Elle est couverte en partie de bosquets et en partie de champs de céréales avec, çà et là, des oliviers. Des crêtes qui bordent la plaine descendent des torrents, à sec l'été, qui forment à leur embouchure de petites plaines alluviales fertiles où l'on cultive surtout des oignons.

A l'est et un peu au nord de Néapolis se trouve le village de Pharaklo qui comprend environ quatre cents habitants. Il est bâti dans la montagne, sur un calcaire foncé, disposé à plat et qui fait saillie sous les chistes cristallins. Un peu plus au nord, et toujours sur la crête calcaire, se trouve le village de Mesochori. A l'est de Pharaklo se trouve le hameau de Paradisio d'où sort une source fraîche et abondante qui alimente un moulin. Le ruisseau a formé des petits plateaux alluvionnaires où se cultivent la vigne, les arbres fruitiers, les oignons et les fèves.

Au sud de Néapolis, en suivant le flanc de la montagne d'où

l'on a une vue magnifique sur la baie, on rencontre le village de Lachi (Lachion) bâti parmi les schistes cristallins. D'après Fiedler, on trouve parmi ces schistes micacés de petits filons de minéral de fer.

Au-dessus de ces schistes se retrouve le calcaire foncé disposé en couches épaisses d'où sortent des sources qui arrosent les plateaux alluvionnaires et les fertilisent. On y cultive l'oranger, le figuier, l'olivier et le caroubier. Autour, la montagne est couverte de buissons formant un maquis assez dense.

De Lachion, au sud, on monte à Saint-Nicolas, bâti au milieu des schistes micacés couverts çà et là d'amas de calcaire. La crête montagneuse, toujours formée de poros néogène, se dirige ensuite jusqu'à la pointe de la presqu'île au Cap Malea. Le versant nord-est de la presqu'île est plus accidenté. Il limite entre la montagne et la côte une plaine étroite formée de sables en conglomérats (poros) et de marnes de néoformation. Cette plaine qui ne dépasse guère 30 mètres d'altitude est en partie couverte de céréales, en partie de taillis. Sur cette côte est se trouvent le village de Velanidia et celui de Katania, ce dernier légèrement au nord de Pharaklo. Nous n'avons pu visiter ces deux villages, mais nous avons pu faire une enquête assez détaillée au village de Monemvasie situé beaucoup plus au nord et où nous n'avons pu trouver aucun cas de Bouton d'Orient.

Néapolis, appelée encore Boiæ, est, comme son nom l'indique, une ville assez récente qui compte environ 4.500 habitants. Elle a été fondée aux environs de 1850 par les habitants des villages de la montagne qui sont marins et pêcheurs pour la plupart et qui en ont fait leur port.

Sa rade assez sûre est régulièrement abordée par les caboteurs. En hiver, pendant les tempêtes qui ne permettent pas de doubler le Cap Malea, les bateaux viennent s'y abriter.

Néapolis a été fondée à l'emplacement de l'ancienne Boiæ (=Viæ). L'histoire nous apprend que lorsque les Doriens vinrent dans la région, ils trouvèrent trois villes : Side, Etis et Aphrodisias ; la première fondée par Danaos et les deux autres par Enée. L'Héraclide Boios qui conduisait la division dorienne, en cette pointe de la Laconie, réunit les habitants des trois villes et fonda une ville nouvelle, Boiæ, à l'empla-

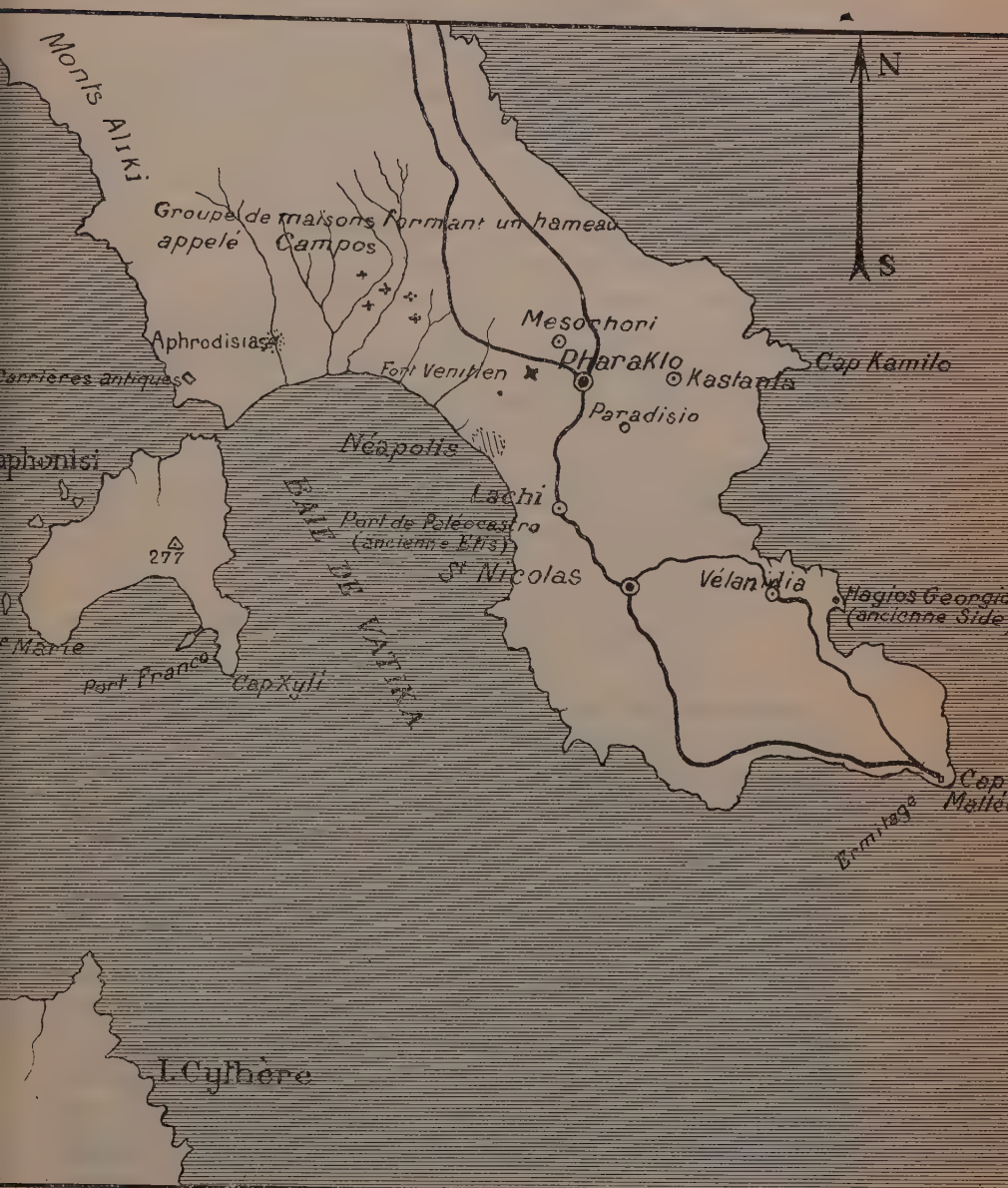


FIG. 1. — Carte de la région de Néapolis.

cement qui leur fut indiqué, dans la plaine couverte de myrtes, par un lièvre envoyé par Artemis. Pausanias vit encore sur ces lieux quelques vestiges de l'ancienne ville : un sanctuaire à Artemis soteira, un temple d'Apollon, un Asclepeion et des sanctuaires à Serapis et à Isis. Actuellement, on ne trouve que des fondations de murs, des débris de tuiles et de tombeaux. Au voisinage de ces ruines, à l'ouest, on trouve de vieilles carrières et, au-dessus de la ville, à mi-chemin de Mesochori, les ruines d'un château moyenageux.

Néapolis s'étage derrière la plage de son port de pêche sur des contreforts de poros néogène où abondent les Pecten et les huîtres. La ville est coupée par un ruisseau, à sec l'été, descendant des hauteurs de Pharaklo et de Mesochori.

Les habitants sont mi-pêcheurs, mi-agriculteurs. Ils importent du vin et de l'huile de la Crète (la Canée) par voiliers. D'assez nombreux Crétois habitent Néapolis où ils sont venus au moment des révolutions.

C. — Résultats de l'enquête.

Nous avons fait notre enquête à Néapolis en examinant le plus grand nombre d'habitants que nous avons pu rassembler et en particulier la presque totalité des enfants. Notre travail a été facilité par M. Nicolas Colyvodiacos et M^{me} S. Zerva qui nous ont non seulement fourni une très cordiale hospitalité, mais ont déployé beaucoup d'efforts pour nous amener le plus grand nombre possible de malades. Les D^{rs} Calcandis et Iatridès, de Néapolis, ont bien voulu également s'intéresser à nos recherches et les favoriser de leur concours. Grâce à toutes ces collaborations nous avons pu faire à Néapolis une enquête très détaillée. Dans les villages environnants où nous nous sommes rendus sous la conduite de M. Nicolas Colyvodiacos, nous avons pu examiner un très grand nombre d'enfants et d'adultes. Bien que plus rapide qu'à Néapolis, notre enquête a été assez approfondie pour nous donner une vue d'ensemble très satisfaisante de la répartition des cas de Bouton d'Orient dans ces agglomérations.

Voici les observations que nous avons recueillies.

4^o CAS RECUEILLIS A NÉAPOLIS.

Du 30 avril au 2 mai 1926, nous avons pu rassembler quatorze observations. Dans la plupart des cas l'examen clinique a été confirmé par l'examen microscopique. Voici la description de ces cas.

OBSERVATION I. — Elle concerne le cas de Stavr. Z., que nous avons décrit plus haut.

OBSERVATION II. — Hélène L..., dix-huit ans, habite dans le quartier de Stavr. Zerv. Elle porte à la joue gauche une cicatrice violacée, ronde, de la dimension d'une pièce de 2 francs. D'après ses dires, à la place de cette cicatrice se trouvait un bouton ressemblant tout à fait à celui de sa voisine Stavr. Zerv., le bouton a duré un an. Il serait apparu en 1922, quelques mois avant l'arrivée à Néapolis des premiers réfugiés d'Asie Mineure.

OBSERVATION III. — Argyro Ch..., vingt-deux ans, porte à l'oreille gauche un bouton qui recouvre tout le lobe de l'oreille et s'étend au bord externe du pavillon. Le bouton est recouvert d'une croûte épaisse, violacée. Ça et là il y a quelques points suppurés. La partie inférieure du lobe de l'oreille est très épaissie et dure. Ce bouton n'est pas douloureux. La malade ne fréquente pas les sujets 1 et 2. Elle aurait remarqué l'apparition du bouton au mois d'août de l'année précédente. Des frottis exécutés avec la sérosité de ce bouton montrent de nombreuses Leishmania.

OBSERVATION IV. — Stam. A..., seize ans, sœur de la précédente et habitant avec elle. Elle porte à la face externe du bras droit deux boutons placés l'un au-dessus de l'autre sur une même ligne verticale.

Le bouton supérieur est de la grosseur d'une petite noix, l'inférieur un peu plus petit. Les frottis exécutés avec la sérosité du bouton supérieur montrent des Leishmania.

OBSERVATION V. — Anastasie A. D..., trois ans, porte à la joue droite (région malaire) un bouton large comme une pièce de 1 franc, en voie de cicatrisation et un autre bouton qui siège plus bas à la région massétérienne. Il est en voie de cicatrisation et recouvert d'une croûte jaunâtre. Les parents ont remarqué ces boutons en septembre de l'année précédente.

OBSERVATION VI. — Smaragdi M..., dix-neuf ans. Elle habite avec sa famille une partie de l'année à Néapolis et une partie de l'année (l'été) dans une maison sise à mi-chemin de Néapolis à Pharaklo. Elle porte à la joue gauche une cicatrice blanche, ronde, large comme une pièce de 2 francs. A cette place, dit-elle, se trouvait un bouton apparu il y a six ans et qui a duré deux ans.

Elle distingue parfaitement ce bouton du furoncle et le désigne par un nom spécial Πεταλίδι (Petalida), c'est-à-dire Patelle. Ce nom est bien choisi, car le mollusque incrusté sur une roche plate évoque de façon assez précise l'image d'un bouton d'Orient non ulcéré se détachant sur la peau.

OBSERVATION VII. — Matina M..., sœur de la précédente, âgée de huit ans, elle porte deux gros boutons. L'un siège à la cuisse droite, à peu près au milieu de la face antérieure (voir fig. 2). Il est gros comme une noix et recouvert d'une croûte épaisse, jaunâtre; l'autre se trouve à la jambe gauche, un peu au-dessous de la rotule, sur la face externe. Ce bouton, plus large que le précédent, est recouvert d'une croûte épaisse violacée. D'après les



FIG. 2. — Cas de Bouton d'Orient observé à Néapolis de Laconie (observation VII).

dièses de sa sœur et d'un frère ces boutons datent du mois d'août de l'année précédente. Les frottis de la sérosité des deux boutons montrent de nombreuses *Leishmania*.

OBSERVATION VIII. — Chryso, sœur des précédentes, six ans. Porte à la joue gauche une cicatrice blanche de la dimension d'une pièce de 2 francs. A la jambe droite, à la partie supérieure de la face antérieure, près de la crête du tibia, il y a une autre cicatrice de même dimension et de couleur violacée. D'après les renseignements fournis par sa sœur aînée elle a eu, il y a trois ans, à la place de ces cicatrices, des boutons qui ont duré un an.

OBSERVATION IX. — Eleni, quatre ans, sœur des précédentes. Comme sa sœur, elle porte la cicatrice, à la jambe gauche, d'un bouton survenu il y a deux ans et qui a duré environ un an.

OBSERVATION X. — Charl..., douze ans, leur frère, porte un bouton à l'oreille

droite sur le bord supérieur du pavillon. La date d'apparition de ce bouton n'a pu être précisée.

OBSERVATION XI. — Tasia Ch..., vingt-trois ans. Rencontrée sur la route, nous déclare qu'elle possède une petite maison située près de la forteresse vénitienne, au bord du ruisseau qui descend de Pharaklo et, qu'en cet endroit, les moustiques abondent. Elle ne couche à cette maison que lorsque les travaux des champs l'y obligent.

Elle porte trois petits boutons, de la grosseur d'une noisette, à la joue gauche, un autre au bras droit, à la face externe; trois boutons saillants et groupés en cercle à la face externe du bras gauche. Un autre bouton couvert d'une croûte épaisse siège à la face interne de la jambe droite.

L'examen microscopique décèle des *Leishmania* nombreuses dans un frottis du bouton du bras droit.

La date d'apparition de ces boutons n'a pu être précisée.

OBSERVATION XII. — Eleni A..., trente-trois ans, porte un bouton de la grosseur d'une petite noix à la joue droite, un autre un peu plus large à la jambe gauche. Ces deux boutons seraient apparus il y a dix mois. Examen microscopique positif.

OBSERVATION XIII. — Eugénie A..., vingt ans, porte à la face externe du bras gauche, près du coude, un gros bouton couvert d'une croûte épaisse, jaunâtre. Ce bouton existait au mois d'août de l'année précédente, mais la date d'apparition ne peut être précisée. Le frottis du bouton montre des *Leishmania*.

OBSERVATION XIV. — Elene K..., neuf ans. A la jambe gauche, à la partie inférieure de la face externe, porte quatre boutons de la grosseur d'une noisette, recouverts d'une croûte assez épaisse et jaunâtre. Date d'apparition non précisée. Pas d'examen bactériologique.

2° CAS RECUEILLIS A PHARAKLO.

Notre enquête faite le 1^{er} mai 1926 dans ce petit village de 300 habitants nous permet de déceler les neuf cas suivants.

OBSERVATION XV. — Elie Ch..., quatorze ans, porte sur la joue droite, à la région malar, un bouton couvert d'une croûte jaunâtre; il a les dimensions d'une pièce de 2 francs. L'enfant se rappelle qu'il y a plus d'un an qu'il porte ce bouton, mais ne peut en préciser la date d'apparition. L'examen microscopique a été positif.

OBSERVATION XVI. — Eleni K..., treize ans, porte un large bouton à la partie inférieure de la jambe, sur la face externe. Ce bouton est couvert d'une épaisse croûte violacée. Il serait apparu à la fin de décembre de l'année précédente. Des frottis de la sérosité de ce bouton montrent de nombreuses *Leishmania*.

OBSERVATION XVII. — Pénélope Ch..., trente-cinq ans, porte à la jambe droite, sur la face antéro-externe, deux gros boutons larges chacun comme

une pièce de 2 francs. Elle ne peut préciser la date d'apparition, mais assure qu'il y a environ un an que ce bouton est apparu. L'examen microscopique est positif.

OBSERVATION XVIII. — Eléni Ch..., sa fille, neuf ans, porte à la joue droite une large cicatrice. Elle portait à cette place un bouton apparu il y a deux ans et qui a disparu complètement depuis six mois environ.

OBSERVATION XIX. — Marigo St..., vingt ans, cette jeune fille porte un gros bouton de la dimension d'une pièce de 2 francs, sur l'avant-bras droit, à la face postérieure près de l'apophyse styloïde du cubitus. Ce bouton date de plus d'un an. Les frottis montrent de nombreuses *Leishmania*.

OBSERVATION XX. — Elenie L., vingt ans. Deux gros boutons à la jambe, sur la partie inférieure de la face antéro-externe, à quelques centimètres au-dessus de la malléole. A la jambe droite un autre bouton en voie de cicatrisation. Ces boutons seraient apparus au mois d'août de l'année précédente.

OBSERVATION XXI. — Georgie Th..., vingt-cinq ans. Au milieu du front, elle porte un petit bouton de la grosseur d'une noisette; à la joue gauche, au-dessous de la région malaire, un autre bouton moins gros. Ces deux boutons sont apparus, dit-elle, ensemble il y a un an.

Les frottis exécutés avec la sérosité du bouton de la joue montrent des *Leishmania*.

OBSERVATION XXII. — Angèle Ph..., trente-six ans, porte un bouton saillant, à la joue droite, de la grosseur d'une noisette. Date d'apparition non précisée.

OBSERVATION XXIII. — Son fils Antonio, cinq ans, porte à la jambe droite (partie inférieure de la face antéro-externe) deux larges cicatrices violacées arrondies, laissées par deux boutons disparus depuis six mois environ et qui ont duré un an.

3° CAS RECUEILLIS A PARADISIO.

Nous n'avons pas fait d'enquête à Paradisio même, petit village de 200 habitants, mais nous avons pu examiner une partie des habitants à l'église Saint-Georges, dans la montagne où ils étaient réunis pour la fête de l'église. Malgré la rapidité de l'enquête et les conditions assez défavorables d'examen nous avons recueilli trois cas.

OBSERVATION XXIV. — Georges K..., vingt ans, porte à l'avant-bras droit un gros bouton, à la partie médiane de la face postérieure, couvert d'une croûte jaunâtre. Ce bouton daterait d'un an. L'examen microscopique a montré des *Leishmania*.

OBSERVATION XXV. — Eleni G..., vingt-six ans, porte à la joue gauche une

large cicatrice de teinte pâle. Elle affirme qu'elle a porté à cette place, pendant deux ans, un bouton qui était apparu il y a cinq ans.

OBSERVATION XXVI. — Son fils Dimitri, cinq ans, porte à la jambe gauche, à la face postérieure, une grosse cicatrice violacée, ronde. A la jambe droite, à la face externe, une cicatrice plus petite, large de deux centimètres. D'après sa mère, ces cicatrices ont été laissées par deux boutons disparus depuis un an environ et qui ont duré une dizaine de mois.

4° CAS RECUEILLIS A LACHI.

Dans ce gros village de 900 habitants, nous n'avons pu recueillir que deux observations.

OBSERVATION XXVII. — Jean B..., neuf ans, porte à la jambe gauche, face externe, partie inférieure, un gros bouton couvert d'une croûte jaunâtre, dont la date d'apparition ne peut être précisée.

L'examen microscopique a révélé l'existence de nombreuses Leishmania.

OBSERVATION XXVIII. — Son frère A..., âgé de quatre ans, présente à la joue droite une large cicatrice d'un bouton qui a duré une année.

5° ENQUÊTE A SAINT-NICOLAS.

Dans ce gros village de 1.200 habitants nous n'avons pu trouver un seul cas de Bouton d'Orient au cours d'une enquête à la vérité assez rapide.

De ces 28 cas 12 se présentent sur des enfants, 15 sur des femmes et 1 seul sur un jeune homme.

La répartition des cas dans les villages autour de Néapolis n'est pas homogène. A Pharaklo et à Paradisio, villages proches de Néapolis, les cas sont nombreux et l'on peut réunir ces trois localités en un seul foyer.

Par contre dans la direction du sud-est les cas sont rares. Nous en trouvons deux seulement à Lachi, grand village de 900 habitants, et, un peu plus loin, Saint-Nicolas qui compte 1.200 habitants paraît indemne. Il y a là un phénomène de dispersion tout à fait comparable à ce que l'on observe en Crète. Autour des foyers principaux *les cas de boutons* ne s'observent qu'à courte distance. La maladie diffuse facilement sur place et n'a aucune tendance à l'extension.

Il n'est pas douteux que pour qu'un foyer de Bouton d'Orient

se crée, il faut un facteur ou un ensemble de facteurs que nous ne pouvons encore préciser.

Bien que le rôle des Phlébotomes, et en particulier de *P. papatasi*, comme agents de transmission soit indiscutable depuis les expériences de Ed. Sergent et de ses collaborateurs [7], il nous reste encore à savoir comment se créent les foyers de Bouton d'Orient et quelles sont les raisons de leur répartition.

Parrot et Foley [8] qui insistent sur la différence épidémiologique que l'on observe entre l'expansion du Bouton d'Orient dans le Tell algérien et dans les foyers sahariens invoquent, pour expliquer ces faits, la densité plus grande de Phlébotomes qui existe dans ces foyers sahariens. Mais s'il n'est pas douteux que l'oasis de Biskra connaît une abondance de Phlébotomes, pendant les mois d'été, qui est inconnue sur les hauts plateaux du Tell, on ne peut faire de pareilles constatations en Grèce. Les Phlébotomes sont aussi communs dans l'Est de la Crète, à Sitia par exemple où le Bouton d'Orient est inconnu, qu'à Candie ou à la Canée, foyers principaux de Leishmaniose cutanée. La région sud de la Crète, Iliérapétra, la plaine de Messara, sont aussi riches et probablement plus riches en Phlébotomes que la côte nord et cependant le Bouton d'Orient y est inconnu.

De même à Pharaklo on ne peut invoquer une densité plus grande de Phlébotomes qu'à Lachi ou à Saint-Nicolas.

Ce qui nous paraît également difficile à expliquer par le seul facteur Phlébotome, c'est la différence que bien souvent on peut noter, au moins en Grèce, entre la transmission de la maladie dans la famille et sa transmission hors de la famille.

Très grande dans le premier cas, elle est faible dans le second. Si, bien souvent, on peut invoquer une contagion de maison qui rendrait très plausible l'action de Phlébotomes il y a des cas où, bien que contagion de famille, il n'y a plus strictement contagion de maison. De tels cas, comme nous l'avons déjà écrit [9], nous paraissent plaider plutôt en faveur de la transmission directe. Nous avons déjà publié une observation que nous avons faite en Crète en 1920. L'un de nous a eu l'occasion de la compléter en 1923 avec le Dr Langeron. Nous croyons intéressant, à titre d'exemple, de la rapporter brièvement : En 1919, un jeune homme qui fait ses études à Candie vient passer les fêtes de Noël dans sa famille à Asites, petit village accroché

aux flancs du mont Malévisia à une quinzaine de kilomètres de Candie. Il est porteur, à ce moment, de deux Boutons d'Orient contractés à Candie; l'un siège sur le front, l'autre sur le nez. Dans le village il n'existe aucun autre cas de bouton d'Orient et la maladie y est inconnue. Ce jeune homme passe les fêtes en famille et s'en va. Un mois après son départ une de ses sœurs voit apparaître un bouton suivi de plusieurs autres dans les mois qui suivent, six au total, puis ses deux sœurs et la mère sont infectées, toute la famille à l'exception du père est contaminée.

De plus, dans une autre maison du village, où habitent les deux cousins de ces enfants, la maladie se propage, les deux enfants présentent au total cinq boutons. Les enfants des deux familles jouent constamment entre eux. Dans le village il n'y a pas d'autre cas. En 1922, le Dr Langeron et l'un de nous retournent à Asites [40], ils révoient la famille et tous les anciens porteurs de boutons dont les lésions sont maintenant cicatrisées. Il n'y a pas de cas dans le village, il n'y en a pas eu en dehors de la famille. Au cours de notre visite avec Langeron, nous capturons dans une maison du village en quelques secondes 13 *Phlébotomus Papatasi*.

Voilà donc un exemple où le Bouton d'Orient malgré l'abondance des Phlébotomes n'a pris aucune extension. Il n'est pas resté localisé à une maison, mais à une famille.

Nous pensons qu'en Grèce, il n'est pas possible d'expliquer le mode irrégulier de répartition du Bouton d'Orient par la plus ou moins grande densité de Phlébotomes. Si les cas sporadiques tels que ceux observés en Algérie et tels que quelques-uns ont pu être observés en Grèce s'expliquent tout naturellement par l'intervention du Phlébotome, il ne semble pas que la plupart des cas que l'on observe dans les régions d'endémicité du Bouton ou qui apparaissent à la suite de l'importation d'un cas relèvent de la même origine.

Nous croyons que dans ces cas la transmission directe joue le rôle principal et permet mieux d'expliquer des singularités de développement telles que nous venons d'en signaler.

Quoi qu'il en soit du mode de transmission du Bouton d'Orient en Grèce et même si le Phlébotome y joue le rôle principal, il nous reste encore à déterminer les causes de son

expansion géographique qui ne paraissent liées ni à l'existence d'une faune d'insectes piqueurs spéciale, ni à une densité variable du nombre des Phlébotomes.

Pour ce qui est du nouveau foyer que nous venons d'étudier, celui de Néapolis, il est difficile de ne pas le rattacher au foyer crétois. Les relations entre Néapolis et la Crète ont été et restent fréquentes.

Au cours des dernières révolutions crétoises, nombreux sont les habitants de Laconie qui sont allés se battre en Crète. Nombreux aussi sont les Crétois qui, fuyant leur patrie, sont venus chercher un refuge en Laconie. Les relations maritimes sont fréquentes encore aujourd'hui et de nombreux voiliers apportent de Crète de l'huile et du vin en Laconie par le port de Néapolis.

Ce qui renforce encore l'idée de l'origine crétoise de ce foyer continental, c'est que l'île de Cythère placée entre la baie de Vatika et l'extrémité occidentale de la Crète est elle-même contaminée comme nous l'avons vu plus haut par les cas observés à l'hôpital Syngros.

Ce qui paraît plus difficile à expliquer, c'est pourquoi la maladie venue de Crète a pu se fixer en Laconie alors que tant de points en Crète situés à courte distance des foyers de Leishmaniose crétoise sont restés indemnes (1)?

Observations complémentaires.

Depuis notre voyage à Néapolis, nous avons eu connaissance de quelques cas de Bouton d'Orient provenant de la Laconie occidentale, de la région du Magne. Ce qui étend l'aire de dispersion du Bouton d'Orient dans le Péloponèse à toute la Laconie.

Le premier cas nous a été signalé par le D^r Joannidès qui l'a observé à Calamata sur un enfant qui s'était contaminé à

(1) Peut-être pourrait-on invoquer la difficulté des communications qui tout récemment encore existait entre les parties sud et nord de l'île et entre la région de l'Est et la ville de Candie? En ce cas, maintenant que le percement des routes a supprimé ces difficultés, nous devons voir le Bouton d'Orient envahir rapidement les régions encore indemnes.

Campos dans le Magne (Laconie) [11]. Depuis, toujours grâce à l'obligeance des médecins de l'hôpital Syngros, nous avons nous-même étudié deux autres cas.

L'un provenant de Cotronas (voir la carte, fig. 3) sur un homme de quarante-cinq ans. Le malade portait un bouton sur

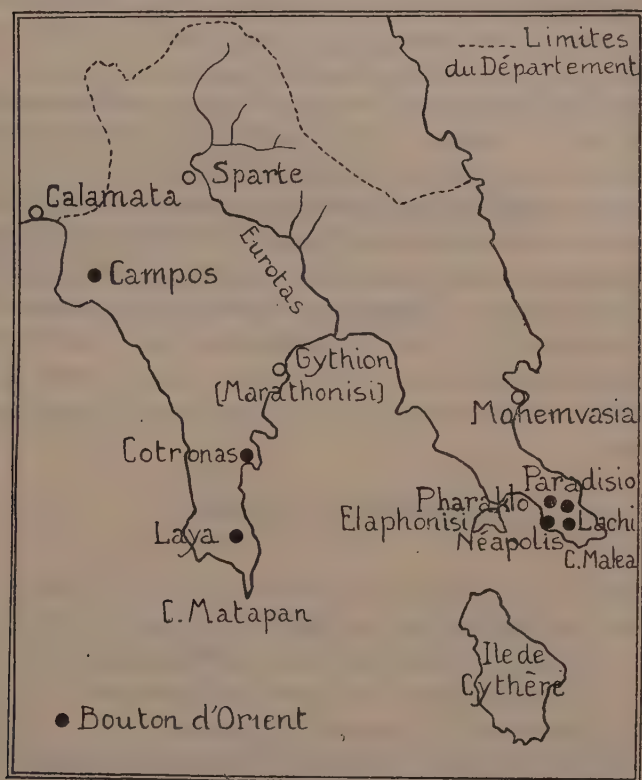


FIG. 3. — Le département de Laconie, avec l'indication des foyers de Bouton d'Orient.

le nez, un autre sur la joue gauche et un troisième très gros à la base du pouce de la main gauche. Ces boutons dataient de plus d'un an. L'examen microscopique a montré de nombreuses *Leishmania*.

L'autre provenait de Laya. Il s'agissait d'un jeune homme portant un bouton sur la crête du nez. Le bouton avait été con-

tracté à Laya. Une fillette de huit ans, dans sa famille, avait eu avant lui un bouton identique, également sur le nez et son propre frère, âgé de trois ans, en portait un sur la joue droite.

Dans un village situé dans la montagne, à deux heures de Laya, à Pachia Nica, le bouton d'Orient ne serait pas rare, d'après ce que nous a dit le médecin du village que nous avons vu à Athènes. Dans cette région, le Bouton d'Orient est appelé Μούρο (Mouro), c'est-à-dire Mûre, d'après sa ressemblance avec le fruit des *Rubus*.

Enfin l'un de nous a fait, avec le D^r Stylianopoulo, une courte enquête dans le village de Campos d'où provenait le cas du D^r Joannidès.

A Campos, nous n'avons pas vu de cas en évolution. Mais les gens du pays connaissent bien le Bouton d'Orient qu'ils appellent eux aussi Mouro. Nous avons pu, grâce à l'amabilité du médecin et des instituteurs de Campos, examiner tous les enfants. Cinq étaient porteurs, à la figure, de cicatrices tout à fait typiques de Bouton d'Orient. Ils avaient contracté ces boutons les uns à Cambos, les autres à un petit village peu éloigné nommé Altamira.

Résumé et conclusion.

Peut-être que des enquêtes ultérieures nous permettront de compléter les observations que nous avons pu faire sur la répartition du Bouton d'Orient en Grèce continentale; mais dès à présent on peut affirmer qu'il existe un foyer assez important dans le département de Laconie (Péloponèse), foyer autochtone, probablement ancien et antérieur certainement à l'arrivée des réfugiés d'Asie Mineure en Grèce.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CARDAMATIS (J. P.), Leishmaniose en Grèce (Bouton d'Orient). *Bul. Soc. Path. exotique*, 2, 1909, p. 257; Observations microscopiques sur un Bouton d'Orient non ulcéré. *Bul. Soc. Path. exotique*, 2, 1909, p. 391.
- [2] CARDAMATIS (J. P.) et MELISSIDIS (A.), Deux cas de Bouton d'Orient dont le premier très rare. Antagonisme probable du Kala-Azar et du Bouton d'Orient. *Bul. Soc. Path. exotique*, 4, 1911, p. 454.

- [3] PHOTINOS (G.), Un nouveau traitement du Bouton d'Orient (de Crète) par des injections locales de chlorhydrate d'émétine. *Bul. Soc. Path. exotique*, **12**, 1920, p. 290.
- [4] BLANC (G.) et CAMINOPETROS (J.), Enquête sur le Bouton d'Orient en Crète. Réflexions qu'elle suggère sur l'étiologie et le mode de dispersion de cette maladie. *Ces Annales*, **35**, 1921, p. 151.
- [5] LANGERON (M.), Mission crétoise de l'Institut Pasteur hellénique, août-septembre 1922. *Archives de l'Institut Pasteur hellénique*, **1**, fasc. 4, 1926.
- [6] HEUYER (G.) et CORNET (L.), Un cas de Leishmaniose cutanée observé dans les Balkans. *Paris méd.*, **9**, 1919, p. 335.
- [7] SERGENT (Ed. et Et.), PARROT (L.), DONATIEN (A.) et BEGUET (M.), Transmission du clou de Biskra par le Phlébotome (*P. papatasi* Scop.). *C. R. Acad. Sciences*, **173**, 21 nov. 1921, p. 1030; Transmission expérimentale du Bouton d'Orient (Clou de Biskra) à l'homme par *Phlébotomus papatasi* (Scopoli). *Ces Annales*, **40**, 1926, p. 410.
- [8] PARROT (L.) et FOLEY (H.), Remarques épidémiologiques sur le Bouton d'Orient en Algérie. *Bul. Soc. Path. exotique*, **18**, 1925, p. 485.
- [9] BLANC (G.) et CAMINOPETROS (J.). V. n° 4.
- [10] LANGERON (M.). V. n° 5.
- [11] JOANNIDÈS (G.), Quelques notes épidémiologiques sur le département de Messénie. *La Grèce méd.*, **28**, n° 9-10, 1926.

SUR LE pH RELATIF DES TISSUS DES MAMMIFÈRES ÉTUDIÉ *IN VIVO* ET SON RÔLE POSSIBLE DANS LA GENÈSE DES TUMEURS

par E. HARDE et P. HENRI (Institut Pasteur).

Les expériences de Pasteur [1] sur la stérilisation et les cultures microbiennes ont démontré l'importance capitale de la réaction des milieux. Plus tard, quelques savants, entre autres Metchnikoff [2], ont également souligné la valeur de ce facteur.

Au cours des dernières années, de nombreux travaux ont été publiés sur la question du pH et ont mis en lumière sa signification en biologie.

Au début, on se contenta d'étudier le pH des tissus morts *in vitro*; plus tard, par l'emploi de la méthode électrométrique, on essaya de déterminer la réaction des tumeurs et des tissus vivants. Tout récemment enfin, on a appliqué à cette étude la méthode colorimétrique intra-vitale. Parmi les promoteurs de cette technique, il faut citer Peyton Rous [3] et Reiss [4].

L'une de nous [5] ayant constaté qu'un milieu acide augmente la virulence du virus des sarcomes de poule Rous, nous avons eu l'idée d'étudier le pH *in vivo* des tumeurs des mammifères (1).

De plus en plus, on est tenté d'admettre que toute tumeur a pour point de départ une irritation préliminaire mécanique ou chimique déterminant la destruction des cellules.

Il a déjà été démontré que l'autolyse des cellules mortes ainsi que tout processus inflammatoire est accompagné d'une réaction acide. L'acidité semble donc être un facteur favorable à la division cellulaire. Peut-on démontrer sa présence dans les tumeurs *in vivo*? C'est dans le but d'élucider cette question que nous avons entrepris les expériences suivantes.

1. Les premières expériences sur les colorations intravitales ont été faites en collaboration avec M^{me} Danysz-Michel.

Nous tenons compte des erreurs possibles dues à la complexité chimique des tissus vivants, à leur coloration initiale, aux différences de concentration de l'indicateur et nous ne prétendons pas apporter des résultats absolus, mais seulement des appréciations relatives des réactions observées.

Des expériences de contrôle faites par Rous [5] ont montré que les phtaléines injectées dans le sang des animaux passent dans les tissus, lesquels restent colorés après avoir été lavés par le liquide de Ringer. De plus, Rous, Drury et Beatty [6], dans leur travaux publiés il y a quelques mois, semblent considérer cette méthode comme assez précise; ils pensent que les causes d'erreur résidant dans la présence des acides gras, de lécithine ou de protéine, dans la transformation des colorants à la surface des cellules, n'étaient pas suffisantes pour enlever aux résultats leur valeur relative. Nous avons suivi la méthode décrite par Rous et nous avons employé trois colorants :

- 1° Pourpre de brome-crésol en injection intra-péritonéale;
- 2° Rouge de phénol en injection intra-péritonéale;
- 3° Bleu de brome-thymol en injection intra-tumorale.

Nos expériences ont porté sur :

- a) Le cancer des souris spontané ou greffé, C. 63 (1);
- b) Le sarcome de souris greffé, S. 37 (1);
- c) Le sarcome du rat (Jensen) (1);
- d) [à titre de comparaison] :

Des embryons de souris ;

Des jeunes rats et souris ;

Des souris adultes normales ;

Des souris vieilles normales ;

Des souris vieilles, porteuses de tumeurs spontanées.

MÉTHODE DE ROUS.

On emploie des souris de 15 à 30 grammes. Les solutions des sels de soude des indicateurs (colorants R. A. L.) sont préparées suivant les indications de Clark [7], dans les proportions suivantes :

1° 0 gr. 1 de rouge de phénol + 5 c. c. 7 de soude N/20;

2° 0 gr. 1 de pourpre de brome-crésol + 3 c. c. 7 de soude N/20.

3° 0 gr. 1 de bleu de brome-thymol + 3 c. c. 2 de soude N/20.

On triture les poudres dans un mortier d'agate, en ajoutant la solution de soude; on dissout ensuite le tout dans de l'eau physiologique à 9 p. 1.000.

L. Ces souches proviennent de l'Institut du Cancer de Londres.

Avec le pourpre de brome-crésol, la manipulation est légèrement modifiée : l'indicateur est mis en suspension dans une petite quantité d'eau salée et la totalité de la solution de soude N/5 est ajoutée en une seule fois.

Des essais faits avec les solutions phosphatées de Sørensen ont montré que nos indicateurs ainsi préparés fournissaient les échelles colorimétriques caractéristiques. Les doses employées furent, pour des souris de 15 à 30 grammes, de 0,5 à 1 cent. cube d'une solution soit à 2 p. 100 de rouge de phénol, soit à 1,7 p. 100 de pourpre de brome-crésol, puis de 0 c. c. 1 à 0 c. c. 2, par voie intra-tumorale, d'une solution à 1 p. 100 du sel de sodium du bleu de thymol.

Les colorations données par ces différents indicateurs varient :

1° Pour le pourpre de brome-crésol : du violet (pH 6,4 à 7,00) au jaune orange (pH 5,4) ;

2° Pour le rouge de phénol : du vieux rose (pH 7,8 — 8,2) au jaune (pH 6,6).

3° Pour le bleu de brome-thymol : du bleu au jaune foncé intense en passant par le vert (pH 7,6 — 6,0).

La solution d'indicateur fraîchement préparée est administrée par injection intra-péritonéale. Ensuite sous légère anesthésie à l'éther, de courte durée afin d'éviter l'acidose, on pratique la dissection ; on a intérêt, ainsi que le recommande Rous, à examiner seulement quelques-uns des tissus, à chaque opération. On doit prendre soin de couper la peau loin du point d'inoculation afin de ne pas souiller la coupe avec l'indicateur libre. Les instruments sont nettoyés à l'eau distillée bouillante et soigneusement séchés. La dissection s'opère sur une couche de paraffine solide, la partie à examiner étant recouverte d'huile de paraffine neutre, pour éviter les modifications des réactions dues, en grande partie, à l'échappement du gaz carbonique provenant des tissus. Toutefois, par la suite, nous avons abandonné cette méthode, car il nous a semblé intéressant d'étudier la réaction en présence d'air : il était possible que la présence d'acides non volatiles produisit les réactions observées dans les néoplasmes. Le tissu à examiner est d'abord observé en bloc, puis coupé en petits morceaux et écrasé entre des lames et lamelles de mica, dans quelques gouttes d'huile de vaseline.

Les examens furent tous pratiqués à la lumière du jour. Le microscope ne montra que des colorations diffuses.

Les teintes obtenues étaient comparées avec celles données par les échelles colorimétriques de Clark et par les solutions étalons conservées en tubes capillaires.

Indicateur : Pourpre de brome-crésol.

SARCOME DE SOURIS S. 37.

Quatre à cinq minutes après l'inoculation intra-péritonéale de 0,5 à 1 cent. cube d'une solution à 1,7 p. 100, les pattes, la queue et les oreilles deviennent bleu clair ; au bout de vingt à trente minutes, la surface entière du corps est colorée en bleu violet foncé.

La dissection de l'animal, pratiquée sous anesthésie légère à

l'éther, donne les résultats suivants : les capsules et le stroma du sarcome sont colorées en bleu violet foncé ; la tumeur en coupe mince examinée entre lame et lamelle de mica présente une teinte jaunâtre (pH 5,8 à 6,2), que l'on peut faire virer au bleu par addition de soude. Le centre nécrosé est jaune. Toutefois, la pénétration de l'indicateur n'est pas constante, dans la partie nécrosée.

Le sang, le tissu conjonctif, l'épiderme apparaissent en violet alors que la rate, le foie et les muscles, le pancréas, le testicule sont jaunâtres.

Des constatations analogues ont été faites avec les tumeurs spontanées et greffées de la souris (carcinome C. 63).

Pour éviter les répétitions, nous ne donnerons pas les protocoles détaillés de ces expériences.

SARCOME DE RAT (Jensen).

Des rats blancs de 135 à 150 grammes sont inoculés avec le sarcome de Jensen dans le flanc. Dix-huit jours après, l'examen du pH est fait au moyen d'une solution à 2 p. 100 de pourpre de brome-crésol injecté par voie intra-péritonéale à la dose de 3 cent. cubes.

Trente à soixante minutes après l'inoculation, la surface de l'animal est bleu violacé, le sang est violet, la capsule de la tumeur est bleue (pH de 7,4 à 7,6) ; une coupe mince de la tumeur examinée entre lame et lamelle de mica se montre d'une teinte jaunâtre, correspondant à un pH de 5,8 à 6,2, sensiblement le même que celui trouvé pour le muscle ; le testicule semble légèrement plus acide (pH 5,4-5,6).

Indicateur rouge de phénol.

SARCOME DE SOURIS S. 37.

On examine des souris de 30 grammes, inoculées avec le sarcome S. 37, depuis huit jours à trois semaines. L'indicateur est injecté dans le péritoine à la dose de 1 cent. cube, d'une solution à 2 p. 100 du sel de sodium. Presque immédiatement, les

oreilles, la queue, les pattes, le museau et la surface du corps offrent une teinte rose; quinze minutes après l'inoculation, toutes ces parties de l'animal sont fortement colorées. L'urine peut être jaune ou rouge, suivant sa propre réaction.

Après trente-soixante minutes, on prélève une coupe mince de la tumeur que l'on examine par la lumière transmise entre lame et lamelle, dans une goutte d'huile de paraffine. Elle présente une coloration jaune virant lentement et incomplètement à l'air, ce qui laisse à penser que l'acidité n'est pas produite en totalité par des acides volatiles (CO_2). Le tissu conjonctif et les tendons sont colorés en rose orange (pH 7,2). Au contact de l'air, ils deviennent rapidement vieux rose (pH 7,6).

Les autres organes sont jaunâtres (pH 6,6).

Des greffes de carcinome C. 63 et des tumeurs spontanées des souris, examinés suivant la même technique, nous ont donné des résultats tout à fait identiques, ainsi que le sarcome du rat de Jensen (1).

Indicateur bleu de brome-thymol.

SARCOME S. 37 ET CARCINOME C. 63 DE SOURIS.

Nous avons pratiqué des injections intra-tumorales à petites doses, 0 c. c. 1 à 0 c. c. 2, doses trouvées suffisantes après divers essais, dans le cas du sarcome et du carcinome de la souris. Ce dernier mode opératoire a l'avantage de permettre l'utilisation d'indicateurs très précieux, tels que le bleu de bromo-thymol (pH 6 à 7,6), dont la toxicité pour la souris en injections intrapéritonéales interdisait tout emploi. Les injections intra-tumorales aux doses de 0 c. c. 1 à 0 c. c. 2 d'une solution du sel de sodium à 1 p. 100 ne paraissent nullement incommoder l'animal, même après plusieurs jours.

Par emploi du bleu de bromo-thymol, nous avons constaté que la tumeur examinée entre lame et lamelle était nettement colorée en jaune, teinte correspondant à un pH voisin de 6.

1. Des rats blancs pesant entre 125-150 grammes ont reçu, en injection intrapéritonéale, 1 c. c. 8 d'une solution à 4 p. 100 de rouge de phénol.

Le rouge de phénol donnait un pH de 6,6 (limite de l'indicateur) et le pourpre de brome-crésol un pH variant entre 5,8 et 6,2.

EMBRYONS DE SOURIS.

Nous avons trouvé intéressant de comparer les pH des tumeurs avec celui des tissus embryonnaires normaux; nous nous sommes adressé à des embryons de souris d'âges divers (du milieu jusqu'à la fin de la gestation, c'est-à-dire environ de dix à vingt jours).

La technique employée était la même : injections intrapéritonéales, chez les souris pleines. Afin de permettre l'imprégnation du placenta par le colorant, il fallait attendre une à deux heures avant l'examen des tissus.

On pratiquait ensuite la laparotomie de la souris mère, légèrement anesthésiée : l'utérus donnait une réaction acide; le placenta présentait une réaction alcaline due au sang de la mère. L'embryon vivant, toujours relié à la mère, fut examiné sur une lame de mica (1) : l'épiderme, les muscles et le tissu conjonctif se sont montrés nettement acides à la limite du rouge de phénol (6,6), ainsi qu'au pourpre de brome-crésol de 5,6 à 5,8, offrant ainsi un contraste frappant avec l'alcalinité de la peau de la mère. Alors que la peau et le tissu conjonctif de la mère prennent une teinte bleue violacée ou rose (suivant l'indicateur), l'embryon se colore en jaune pâle. Le colorant avait bien pénétré dans l'embryon, car soit après l'exposition à l'air pendant un certain temps, soit par virage avec la soude, on obtenait la réaction alcaline (violettes ou roses selon le colorant employé). Comme il était à prévoir, la concentration en colorant est beaucoup plus faible que dans les tissus de la mère.

Nous avons ensuite examiné les différents tissus et organes de l'embryon. Le sang du cœur était prélevé dans des pipettes de verre neutre sous une couche d'huile de vaseline. Examiné en couche mince entre lame et lamelle de mica, dans une goutte d'huile de vaseline, il présente une légère teinte jaunâtre (pH 5,6 à 5,8). Cette coloration est bien due à la présence de

1. Afin d'empêcher l'élimination du CO₂, les embryons étaient partiellement recouverts d'huile de vaseline neutre.

l'indicateur puisque quelques gouttes d'une solution alcaline la font virer au bleu. Dans les autres organes : foie, rate, rein, cerveau, nous n'avons pas pu déceler nettement la présence du colorant. Ces résultats sont très voisins de ceux obtenus par P. Mendeleef [8] au moyen de la méthode électrométrique. Cet auteur donne les chiffres suivants : sérum sanguin de cobaye-mère pH 7,4; sérum sanguin embryonnaire pH 5,8; liquide imprégnant les tissus embryonnaires pH 6.

Influence de l'âge des animaux sur leurs réactions tissulaires et humorales.

L'organisme animal étant le siège de modifications cellulaires continuelles, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier les variations de ses réactions aux diverses périodes de son existence.

Nous avons donc pris de jeunes rats blancs de deux jours, pesant environ 5 à 6 grammes auxquels nous avons injecté des doses de 0 c. c. 1 à 0 c. c. 2 d'une solution de rouge de phénol. Nous avons observé une coloration très rapide des téguments. Vue par la lumière directe, la surface du corps était orange (pH 6,8 à 7,0). Un pli de la peau du dos, fait en évitant d'exercer une pression capable d'entraver la circulation, se montra, par examen à la lumière transmise, d'une couleur jaune un peu rosé, correspondant à un pH voisin de 6,6 à 6,9, donc légèrement plus alcalin que celui des embryons, alors que les rats adultes avaient fourni des réactions voisines de 7,4 à 7,6.

Remarquons que, dans cette expérience, nous n'avons pratiqué aucun prélèvement; nous n'avons donc pas eu recours à l'anesthésie, évitant par là même toute complication d'acidose.

Dans une seconde expérience, 2 jeunes souris de trois semaines reçoivent, par voie intra-péritonéale, 0 c. c. 1 de rouge de phénol, dose nullement toxique (1), ainsi que nous l'avons établi, on injecte à leur mère (âgée de cinq à six mois)

1. Les animaux ne présentent aucun signe d'intolérance ni au moment de l'injection, ni au cours des jours suivants.

0 c. c. 7 du même indicateur. Presque en même temps, 2 vieilles souris, âgées de dix-huit mois environ, sont soumises au même traitement.

Dix à quinze minutes plus tard, les animaux sont déjà très colorés :

a) Les 2 jeunes souris, quinze à vingt minutes après l'injec-

pH

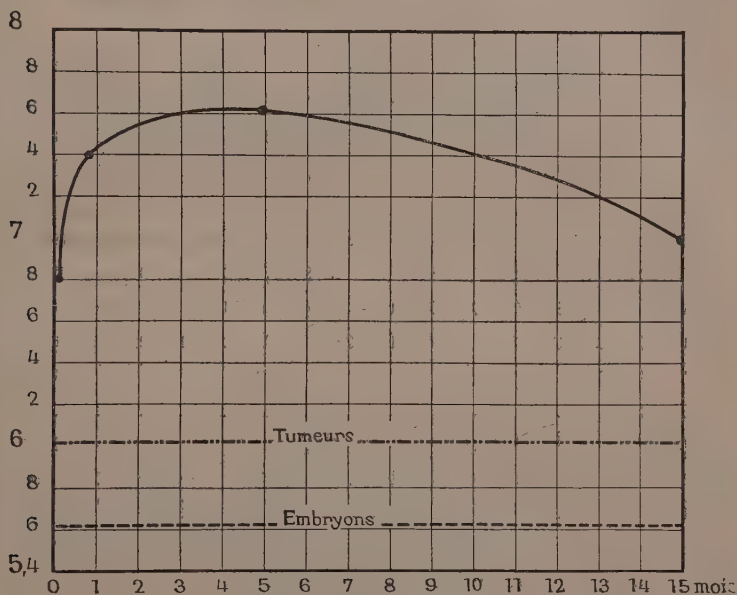


FIG. 1. — Courbe des pH relatifs des tissus des mammifères observés, *in vivo*, durant les diverses périodes de la vie (rats et souris).

tion, présentent une teinte orange-rosée, qui devient vieux rose au bout de trente minutes (pH 7,2 à 7,6).

b) La mère offre une coloration vieux rose (pH 7,6 à 7,8).

c) Enfin les deux vieilles souris sont entièrement colorées en orange (pH 7,0 à 7,2).

Une autre série d'expériences nous a donné les résultats analogues. Nous avons examiné :

a) 2 vieilles souris normales (quinze à dix-huit mois).

b) 2 vieilles souris de quinze à dix-huit mois, porteuses de tumeurs spontanées.

c) 2 souris jeunes adultes normales de quatre à cinq mois, servant de témoins.

Tous ces animaux ont reçu, par voie intrapéritonéale, 0 c. c. 5 de la solution colorante.

Les 2 vieilles souris ont été colorées en orange (pH 7,0 à 7,2).

Les 2 souris porteuses de cancer spontané ont également donné un pH voisin de 7,0 à 7,2.

Enfin, les 2 souris jeunes adultes ont pris une teinte vieux rose indiquant un pH de 7,4 à 7,6.

Ces colorations, observées par la lumière transmise ou directe, s'étendent à la surface entière du corps (oreilles, pattes, queue, etc.). Pour faciliter l'examen par lumière transmise, on soulevait légèrement un pli de la peau (pli axillaire) à l'aide des poils.

L'intensité de la teinte pouvant varier avec la concentration de l'indicateur présent dans les tissus, nous avons gardé nos animaux en observation depuis le début de l'apparition de la coloration jusqu'à son atténuation, nous avons également fait varier les doses injectées de 0 c. c. 5 à 0 c. c. 7. Nous avons fréquemment observé de légères différences individuelles dans la rapidité et l'intensité de la diffusion de l'indicateur, de même qu'une certaine variation de teinte (c'est-à-dire des pH de 7,4 à 7,8) chez de jeunes souris adultes saines, alors que de vieilles souris soit normales, soit porteuses de tumeurs spontanées, nous ont donné des pH de 7,0 à 7,2.

Des rats de deux jours, bien que légèrement plus alcalins que les embryons, sont acides par rapport à de jeunes rats adultes.

Les jeunes souris de trois semaines offrent la réaction la plus proche de celle des jeunes souris adultes.

Discussions.

De toutes les expériences exposées précédemment, il résulte que la réaction des tumeurs des rats et des souris est à pH 5,8-6,2. Malgré la concordance de nos essais, nous nous rendons bien compte qu'il serait prématuré de vouloir attacher à ces chiffres une valeur absolue, mais il nous semble néan-

moins intéressant de souligner le fait que, quelles que soient les imperfections des méthodes colorimétriques lorsqu'elles sont appliquées à des substances aussi complexes que les tissus vivants, la réaction de ces tissus pathologiques est nettement acide. Nos résultats confirment pleinement ceux de Rous à savoir que tous les tissus (rate, foie, pancréas, muscle) présentant un métabolisme actif, ont un pH voisin de 6 à 6,2. Nous avons établi que l'embryon de souris est très acide, que les animaux nouveau-nés sont déjà moins acides. Dès la troisième semaine, ceux-ci donnent une réaction sensiblement analogue à celle des souris adultes de trois à six mois. Des souris vieilles soit normales, soit porteuses de tumeurs spontanées, montrent une nouvelle baisse de pH .

D'après les résultats observés, il semble plausible d'admettre que la baisse de pH enregistrée au cours de la vieillesse serait le fait du ralentissement progressif de la circulation et des phénomènes d'oxydation. Ceci apparaît donc comme un fait d'ordre général.

Dans le cas des néoplasmes, un autre facteur intervient. Ces formations sont, semble-t-il, toujours liées à une irritation mécanique ou chimique, qui déterminent la mort des cellules, ou tout au moins des processus congestifs et inflammatoires, donnant lieu à l'élaboration d'une acidité locale (moins facilement neutralisée chez les animaux âgés que chez les jeunes).

Il ressort donc de ces considérations que la baisse générale du pH , constatée chez les souris âgées, est un facteur très important dans la période pré-cancéreuse. De nombreuses observations ont mis en lumière le rôle prépondérant de l'acidité tant dans la genèse des tumeurs que dans la défense du tissu vivant. Citons seulement quelques-uns des faits se rapportant à la question.

Erwin Smith [9] a établi que les tumeurs végétales sont causées par un bacille (*B. tumefaciens*). Smith et ses collaborateurs montrent que le bacille agit indirectement par la production d'acide lactique. Tout récemment, cette théorie s'est trouvée confirmée par les travaux de Blumenthal [10] et Meyer. Ces auteurs ont réussi à produire des tumeurs typiques dans des tranches de carottes, à l'aide d'acide lactique. Des expériences analogues dans le règne animal sont malheureu-

sement plus compliquées. Si cette réaction accélère la division des cellules, on est en droit de lui attribuer une importance considérable dans la formation des tumeurs, puisque l'irritation qui précède l'apparition du néoplasme a toujours pour résultat la formation d'une acidité locale. Rhodenburg [11] a basé en partie, sur ce fait, sa théorie de l'étiologie des tumeurs.

Rappelons également les expériences publiées par l'une de nous [5], sur l'accroissement de la virulence du sarcome de la poule de Rous, par acidification à l'aide de phosphates acides. Il est également à noter que dans les travaux de Gye [12] faits avec le même virus, l'augmentation de la virulence est toujours concomitante avec l'existence d'une réaction acide, alors que dans les essais témoins, la réaction est neutre ou alcaline. Citons enfin les observations de Warburg [13], Rosener et Negleim qui ont montré que la glycolyse est particulièrement accentuée dans les cellules des tumeurs malignes, observations *in vitro* qui concordent d'ailleurs avec celles qui ont été signalées par P. et T. Cori [14]. Ces auteurs ont montré que le plasma sanguin provenant d'une aile portant une tumeur (sarcome de poule) est plus riche en acide lactique que le plasma tiré de l'aile saine du même animal.

Il y a quelques mois, Fujimaki [15] a produit le carcinome gastrique, en employant une méthode spéciale, chez les rats blancs soumis à un régime dépourvu de vitamine A. Il considère que dans le carcinome expérimental, il y a deux facteurs étiologiques différents : l'un résidant dans la constitution générale, l'autre, dans une cause locale (traumatisme). L'auteur conclut, de ces travaux sur les vitamines, que l'apparition du carcinome gastrique est en rapport étroit avec la suppression de vitamine A.

M. Carrison [16] a publié antérieurement un cas de carcinome gastrique chez un singe soumis à un régime privé de certaines vitamines.

A la lumière de ces données, examinons quelques-uns des faits tout récents observés dans le domaine des vitamines, Hess [17] remarque que les pigeons privés de vitamine B sont beaucoup plus sensibles que les pigeons sains à l'intoxication par le cyanure de potassium. D'autre part, Saiki [18] note que des rats soumis à un régime dépourvu de vitamine A ou B supportent

des doses de sulfate de strychnine plus fortes que celles tolérées par les témoins. Enfin Simonnet et Randouin [49] ont constaté la production d'acidose chez les animaux privés de vitamine B. Peut-on expliquer, par cette acidité, la sensibilité des pigeons au cyanure de potassium et la résistance des rats au sulfate de strychnine? Dans le cas du cyanure de potassium, le radical *acide* est l'élément toxique, alors que dans le sulfate de strychnine, c'est le radical alcaloïde *basique* qui assume ce rôle.

Schoen [20], dans son livre sur « les Fermentations », consacre un chapitre à l'importance de la réaction du milieu. Cet auteur dit : « La toxicité des alcaloïdes augmente avec l'alcalinité du milieu, et cette augmentation est très vraisemblablement due à la mise en liberté de la base de l'alcaloïde employé généralement à l'état de sel. L'acidité, par contre, favorise l'action toxique de substances dont la toxicité est déterminée par le radical acide. »

Rappelons aussi les travaux de Michaelis et Dernby [21] tendant à prouver que l'action des alcaloïdes basiques tels que la cocaïne est atténuée en présence d'un milieu de pH bas. Enfin, chose bien connue en physiologie, on sait que dans les tissus enflammés de pH 6,0 environ, on doit injecter des doses beaucoup plus élevées de sels de cocaïne que dans les tissus sous-cutanés normaux, afin d'obtenir les mêmes effets.

Jusqu'à présent il n'existe pas, à notre connaissance, d'observations concernant les réactions générales des tissus dans les avitaminoses. Nous avons commencé à étudier par la méthode de coloration intra-vitale, appliquée à de jeunes rats, les rapports entre le pH *in vivo* et les différents régimes avitaminés auxquels ces animaux sont soumis.

Les résultats de nos expériences nous incitent à penser que l'acidité est un facteur favorable au développement de tumeurs; toutefois nous n'essaierons pas, dès maintenant, d'affirmer que l'abaissement du pH stimule seulement la division cellulaire; il se pourrait que le virus du cancer, si son existence arrive à être prouvée, ne pût se développer que dans un milieu lui assurant un pH optimum de 6,0 à 6,2.

*
* *

En résumé, par l'application de la méthode colorimétrique intra-vitale, nous avons obtenu les résultats suivants : A l'aide du pourpre de brome-crésol, du rouge de phénol et du bleu de brome-thymol :

1° Dans les tumeurs des souris (greffes de sarcome S. 37, carcinome C. 63, carcinome spontané), nous avons observé un pH inférieur à 6,6, lorsque la détermination est effectuée à l'aide du rouge phénol, limite de l'indicateur ; cette réaction correspond à pH 6 lorsqu'on colore avec le bleu de brome-thymol et elle est située à pH 5,8-6,2 si l'on emploie le pourpre de brome-crésol ;

2° Dans les sarcomes du rat blanc (greffe J. R. S.), des pH de : 6,6 par le rouge de phénol et de 5,8 à 6,2 par le pourpre de brome-crésol ;

3° Dans les embryons de souris blanches, des pH de 6,6 par le rouge de phénol et de 5,6 à 5,8 par le pourpre de brome-crésol ;

4° A l'aide du rouge de phénol seulement :

a) Chez les souris et les rats très jeunes sains, des pH de 6,6 à 7,2 ;

b) Chez les souris adultes saines (quatre à six mois) des pH de 7,4 à 7,8 ;

c) Chez les souris vieilles saines ou porteuses de tumeurs (seize à dix-huit mois), des pH de 7,0 à 7,2 (Voir courbe).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PASTEUR. *Etudes sur la bière*, p. 35.
- [2] METCHNIKOFF. *Ces Annales*, **3**, 1889, p. 28.
- [3] PEYTON ROUS. *Journ. of exper. Med.*, **41**, 1925, p. 451, 739.
- [4] REISS. *C. R. Soc. de Biol.*, **91**, 1924, p. 1433.
- [5] E. HARDE. *C. R. Soc. de Biol.*, **94**, 1926, p. 1346 ; *Journ. of trop. Med. and Hyg.*, juin 1926, p. 159 ; avec DANYSZ-EICHEL. *C. R. Soc. de Biol.*, **95**, 1926, p. 1489 ; avec P. HENRI. *Ibid.*, **96**, n° 8, 1927, p. 535.
- [6] ROUS, DRURY et BEATTY. *Journ. exper. Med.*, **43**, 1926, p. 669 et 687 ; **45**, n° 1, 1927, p. 23 et 41.
- [7] CLARK. *The determination of Hydrogen Ions*.
- [8] MENDELEEF. *C. R. Soc. de Biol.*, **88**, 1923, p. 293.

- [9] ERWIN SMITH. *An introduction ot Bact. Diseases.*
- [10] BLUMENTHAL et MEYER. *Zeit. f. Krebsforschung*, **21**, 1925, p. 250.
- [11] RHODENBURG. *Journ. Cancer Research*, t. IX, n° 1, 1925.
- [12] GYE. *Lancet*, **209**, 18 juin 1925.
- [13] WARBURG, ROSENER et NEGLEIM. *Biochem. Zeitschr.*, **152**, 1924, p. 309.
- [14] P. et T. CORI. *Journ. of biol. Chem.*, **65**, 1925, p. 397.
- [15] FUJIMAKI. Publications of League of Nations III. Health, 1926, III-25.
- [16] MC. CARRISON. *R. Ind. Journ. med. Res.*, **7**, 1910, p. 342.
- [17] HESS. *Zeit. f. physiol. Chem.*, **117**, 1921, p. 284.
- [18] SAIKI. Public. of League of Nations. IIII. Health, 1926, III, 25.
- [19] SIMONNET et RANDOUIN. *Bull. de la Soc. de Chim. biol.*, **7**, n° 6, 1925, p. 734.
- [20] SCHOEN. *Le problème des fermentations.*
- [21] MICHAELIS et DERNBY. *Zeit. f. Immunitätsfors*, **34**, 1922, p. 194.

RECHERCHES SUR LE PHOSPHORE DU SÉRUM

par M. MACHEBOËUF.

Le sérum contient du phosphore et depuis longtemps de nombreux biologistes en ont entrepris l'étude, mais ils se sont surtout appliqués à connaître les variations pathologiques des phosphates sanguins.

Ainsi que le montrent les résultats suivants, ce phosphore salin n'est qu'une faible fraction du phosphore total du sang.

Les protides précipités lors de la désalbumination trichloracétique entraînent du phosphore en quantités très notables et le filtrat désalbuminé contient les phosphates, mais aussi, comme nous allons le voir, d'autres composés phosphorés.

En dosant le phosphore total d'un sérum et parallèlement le phosphore salin du même sérum, on trouve deux chiffres très dissemblables (1).

Chez le cheval, le phosphore total varie de 0 milligr. 096 à 0 milligr. 120 par centimètre cube de sérum; — chiffre normal moyen 0 milligr. 110.

Le phosphore salin varie de 0 milligr. 018 à 0 milligr. 045 par centimètre cube de sérum; — chiffre normal moyen 0,035.

La différence est énorme, le phosphore salin n'est qu'une faible fraction du phosphore sérique total: un tiers environ.

Une première idée se présente à l'esprit: une grosse proportion de phosphore salin est absorbée par le précipité trichloracétique des protides, mais il faudrait admettre une adsorption extraordinairement importante des deux tiers du phosphore total.

Une autre hypothèse possible est la présence d'un composé phosphoré précipitable avec les protides.

(1) La méthode de microdosage employée a été décrite en détail par l'auteur dans le *Bulletin de la Société de chimie biologique*, 7, n° 5, p. 464 (mai 1926) et 9, n° 1, p. 99 (janvier 1927). En voici le principe: destruction sulfonitrique des matières organiques, précipitation du phosphomolybdate d'ammoniaque qui est recueilli sur un microfiltre d'amiante, puis titrage de l'ammoniaque combinée à l'acide phosphomolybdique.

Une troisième hypothèse enfin : existence dans le filtrat d'un composé phosphoré ne laissant pas son phosphore se précipiter directement à l'état de phosphomolybdate.

Pour choisir parmi ces hypothèses, il est d'abord facile de doser le phosphore salin dans un volume connu du filtrat trichloracétique et le phosphore du précipité trichloracétique correspondant.

Voici comme exemple les résultats obtenus avec un sérum de cheval :

I. — P. total du sérum, par centimètre cube de sérum	0 milligr. 417
II. — P. salin dans le filtrat, par centimètre cube de sérum	0 milligr. 043
III. — P. dans le précipité protidique de 1 cent. cube de sérum	0 milligr. 059

On peut ainsi constater ce qui suit :

1° Le précipité protidique est très riche en phosphore et entraîne environ la moitié du phosphore total.

2° La somme du phosphore salin et du phosphore du précipité est inférieure de 0,015 au chiffre trouvé pour le phosphore total du sérum, il doit donc se trouver dans le filtrat une quantité de phosphore supérieure à celle dosée comme salin, ceci semble vérifier la troisième hypothèse, mais, pour expliquer la grande quantité relative de phosphore contenue dans le précipité, il faut encore avoir recours à l'une des deux premières hypothèses : adsorption énorme ou composé phosphoré précipité avec les protides.

Pour préciser un peu les données du problème, il faut, tout d'abord, vérifier par dosage si le filtrat contient réellement plus de phosphore que l'on n'en dose comme salin.

Pour cela un certain volume de filtrat est évaporé à sec, puis le résidu est soumis à la destruction sulfonitrique, puis au dosage du phosphore.

Voici comme exemple les résultats obtenus avec le filtrat du sérum étudié plus haut (les résultats sont calculés pour 1 cent. cube de sérum).

P. total du filtrat après destruction sulfonique	0,061
Or nous avons trouvé :	
P. salin du filtrat	0,043
Différence	0,018

Il y avait donc, dans le filtrat correspondant à 1 cent. cube de sérum, 0 milligr. 018 de phosphore non précipité par précipitation directe dans le filtrat, soit par litre de sérum 18 milligrammes.

A quel état se trouve cette quantité notable de phosphore?

Un premier fait peut nous guider : le composé phosphoré inconnu est hydrolysable et donne par hydrolyse de l'acide phosphorique.

Exemple : Le dosage effectué sur 20 cent. cubes d'un filtrat trichloracétique laissé seulement cinq minutes au bain-marie avant d'ajouter le molybdate d'ammonium donne 0 milligr. 162 de phosphore (2 c. c. 90 de NaOH N/2).

Sur 20 cent. cubes du même filtrat, laissés au bain-marie six heures avant d'ajouter le molybdate, le dosage donne 0 milligr. 243 de phosphore (4 c. c. 33 de NaOH N/20).

L'hydrolyse acide prolongée a donc fait apparaître 0 milligr. 081 de phosphore préalablement non précipitable. L'hydrolyse est d'ailleurs lente et ne semble pas même complète après six heures à 100° en présence de 15 p. 100 d'acide sulfurique. Pendant les premières heures l'hydrolyse libère naturellement plus d'acide phosphorique que pendant les dernières lorsque presque tout le composé est déjà hydrolysé; dans l'expérience ci-dessus, au cours de la première heure, la quantité de phosphore libéré par hydrolyse fut 0,020, il n'est donc pas négligeable de laisser le liquide plus de cinq minutes au bain-marie avant de précipiter l'acide phosphorique par le molybdate.

Avant de m'apercevoir de ce fait je laissais de vingt à trente minutes au bain-marie avant de précipiter et le phosphore libéré par hydrolyse m'est ainsi assez longtemps resté inaperçu, je n'opérais alors que sur de très petites quantités de sang ou de sérum et j'attribuais aux erreurs inhérentes à toute méthode de dosage les très légères différences constatées entre les dosages me donnant, d'une part, le phosphore total du sérum et, d'autre part, la somme P. salin + P. entraîné par le précipité des protides (Cf. *Soc. chimie biol.*, 16 nov. 1926).

La constance de cette petite erreur, toujours par défaut, m'a décidé à essayer sur de plus grandes quantités de sérum, et des différences nettement supérieures aux erreurs possibles se sont alors manifestées.

Le composé phosphoré hydrolysable semble se comporter

comme un éther-sel, il fut donc logique d'essayer de le saponifier par de la soude. L'expérience réussit parfaitement, effectuée de la manière suivante :

Le filtrat trichloracétique est additionné de lessive de soude jusqu'à forte alcalinité, puis porté au bain-marie bouillant pendant quinze minutes; le liquide refroidi est ensuite neutralisé par de l'acide sulfurique et additionné de 1 cent. cube d'acide sulfurique pur en excès et de 2 cent. cubes de solution saturée de nitrate d'ammonium, puis la précipitation par le molybdate est effectuée après un nouveau séjour de cinq minutes au bain-marie. Sur le même filtrat, on opère parallèlement une précipitation après hydrolyse acide de six heures et une simple précipitation du phosphore salin après cinq minutes au bain-marie. Voici les résultats obtenus avec un filtrat de sérum de cheval (1).

	LIQUEUR TITRÉE en centimètres cubes
Sans hydrolyse.	3,50
Après hydrolyse de six heures.	3,90
Après saponification par la soude	4,10

Il a naturellement été vérifié par un essai à blanc que la soude ne contenait pas d'acide phosphorique.

Il est donc permis de conclure à une libération beaucoup plus rapide et plus complète de l'acide phosphorique par la soude que par l'hydrolyse acide.

Ces résultats sont très favorables à l'hypothèse émise plus haut : présence d'un éther-sel phosphorique très stable.

La quantité d'acide phosphorique ainsi éthérifié dans le sérum étudié au début de ce chapitre correspondrait à 18 milligrammes de phosphore et serait donc de 57 milligrammes d'acide phosphorique éthérifié par litre de sérum, soit près de 6 centigrammes.

ESSAI DE RECHERCHE DE L'ALCOOL COMBINÉ A L'ACIDE PHOSPHORIQUE.

Le composé phosphoré hydrolysable n'est pas précipité par la mixture magnésienne à l'état de phosphate ammoniaco-

(1) Ce sérum était exceptionnellement pauvre en composé phosphoré hydrolysable.

magnésien et les quantités de phosphore ainsi précipitées correspondent presque au phosphore dosé comme salin par la méthode indiquée plus haut. Le filtrat séparé du phosphate ammoniaco-magnésien contient encore naturellement du phosphore et l'on constate facilement qu'après neutralisation exacte à l'acide chlorhydrique le phosphore restant est entièrement précipité par la baryte ou l'acétate de plomb.

Grâce à cette observation j'ai essayé la technique suivante pour tenter de séparer l'alcool combiné à l'acide phosphorique.

Un grand volume de sang défibriné est centrifugé, le sérum dilué de trois volumes d'eau est précipité par un volume d'acide trichloracétique à 20 p. 100, puis filtré sur papier Chardin avec l'aide d'un vide partiel. Le filtrat est amené par de la soude au pH 6, puis additionné d'acétate de plomb jusqu'à ce qu'une nouvelle addition ne produise plus de précipité. Le précipité est recueilli par centrifugation, puis remis en suspension dans de l'eau distillée et soumis à un courant prolongé d'hydrogène sulfuré. Le suture de plomb est séparé par filtration, puis l'excès d'hydrogène sulfuré est chassé par un courant d'air énergique passant dans le liquide chauffé légèrement à 40° environ.

Un dosage du phosphore salin sur le liquide ainsi préparé donne un résultat bien plus élevé que celui effectué sur le filtrat trichloracétique primitif et laisse prévoir une décomposition partielle du composé phosphoré hydrolysable.

Pour précipiter le phosphore salin sans risquer une action trop vive sur le composé inconnu, le filtrat est additionné de chlorure de magnésium, de chlorure d'ammonium et d'ammoniaque, le phosphore salin donne un précipité de phosphate ammoniaco-magnésien bien pur et ne perdant à la calcination que la quantité théorique d'eau pour se transformer en pyrophosphate. Ce précipité n'entraîne donc bien que de l'acide phosphorique et aucun composé organique du phosphore.

Le filtrat débarrassé du phosphate ammoniaco-magnésien est légèrement acidifié par de l'acide acétique puis additionné d'acétate de plomb jusqu'à ce qu'une nouvelle addition ne produise plus de précipité. Le précipité recueilli par centrifugation est lavé à plusieurs reprises avec une solution très diluée d'acétate de plomb, puis deux fois avec un peu d'eau bien

neutre. Le précipité plombique est ensuite remis en suspension dans de l'eau et décomposé par l'hydrogène sulfuré, le sulfure de plomb est enlevé par filtration, puis l'hydrogène sulfuré chassé par un courant d'air énergique. L'addition de baryte en léger excès fait alors apparaître un précipité qui est recueilli après quelques heures par centrifugation, lavé avec de l'eau de baryte très diluée, puis redissous dans la quantité strictement nécessaire d'acide chlorhydrique dilué (1 volume d'acide concentré pour 10 volumes d'eau). La solution ne doit pas être trop acide, il faut donc opérer avec soin cette redissolution pour ne pas mettre d'excès d'acide chlorhydrique. L'addition d'une grande quantité d'alcool à 95° produit un précipité qui est recueilli par centrifugation, redissous dans le moins d'eau possible et reprécipité par l'alcool, puis redissous et reprécipité encore pour le purifier autant que possible. Ce précipité analysé contient du baryum, du phosphore et aussi du carbone, mais pas de soufre ni d'azote en quantités appréciables. La présence en quantité notable de carbone laisse prévoir la présence dans ce précipité d'un composé organique.

Nous avons déjà constaté précédemment que l'acide phosphorique se séparait par hydrolyse acide prolongée du complexe où il se trouve engagé, il est donc naturel d'essayer de libérer le composé organique par une telle hydrolyse du précipité barytique.

L'acide sulfurique doit être choisi, car il est facile d'en éliminer l'excès par de la baryte. Le précipité barytique étudié est donc additionné d'un excès d'acide sulfurique à 10 p. 100 et soumis à l'hydrolyse pendant trois journées au bain-marie bouillant, puis alcalinisé par de la baryte qui précipite l'excès d'acide sulfurique et aussi l'acide phosphorique libéré par hydrolyse. Le précipité barytique est enlevé par filtration et lavé avec de l'eau de baryte très diluée. Le filtrat et les eaux de lavage sont réunis et l'excès de baryte est précipité par un courant de gaz carbonique, puis séparé par filtration.

Le filtrat est concentré par distillation à basse température sous pression réduite et lorsqu'il ne reste que peu de liquide, l'addition d'alcool produit un précipité gélatineux qui se sépare par centrifugation. Ce précipité est redissous dans très peu d'eau et la solution additionnée d'alcool en quantité juste suffi-

sante pour produire un très léger début de précipitation, le mélange est transvasé dans une capsule en verre et mis dans un dessiccateur en présence de chlorure de calcium; après un temps assez long apparurent quelques cristaux, lamelles microscopiques, et comme leur formation était très lente, j'ai ajouté tous les jours à la solution II gouttes d'alcool, le volume, et surtout le nombre des cristaux, augmentèrent.

Les cristaux séparés furent desséchés dans le vide en présence d'acide sulfurique jusqu'à poids constant.

Les cristaux secs ainsi obtenus perdent seulement des traces d'eau à l'étuve à 100°, mais semblent subir une légère décomposition à cette température, car ils jaunissent légèrement.

L'analyse qualitative donne : carbone, hydrogène et baryum, pas d'azote, pas de soufre, pas de phosphore ou tout au plus des traces à peine perceptibles et indosables.

L'analyse quantitative fut faite ainsi : dans une petite nacelle tarée est pesée une prise d'essai de 0 gr. 03 environ. La nacelle avec son contenu est introduite dans un tube de verre dur entouré de toile métallique, puis dans le tube on fait passer un courant pas trop rapide d'oxygène bien purifié, puis le tube est chauffé pour produire la combustion de la substance, combustion d'ailleurs assez difficile. Après refroidissement, la capsule et le tube de verre (à cause des parcelles projetées) sont lavés à l'acide chlorhydrique dilué et, dans la solution ainsi obtenue, le baryum est dosé par pesée après précipitation à l'état de sulfate.

Voici le résultat obtenu :

Prise d'essai	0 gr. 0311
SO ⁴ Ba pesé.	0 gr. 0204
Ba trouvé.	0 gr. 0120
Soit Ba p. 100.	38,6

Il est à remarquer que la pesée peut être entachée d'une erreur de 0 milligr. 1, ce qui donne pour la teneur en baryum $38,6 \pm 0,2$.

Ce résultat concorde parfaitement avec celui obtenu par I. Greenwald, exposé dans un mémoire (1) qui m'est parvenu seulement au cours de ce travail; cet auteur a pu isoler, par une méthode voisine de celle employée ici, de l'acide glycé-

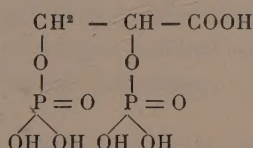
(1) *The Journal of biol. Chem.*, 63, n° 2, p. 339.

rique du sang de porc. Les résultats de mes analyses sont, aux erreurs d'expériences près, les mêmes, il s'agirait donc, ici aussi, d'acide glycérique, les cristaux seraient du glycérate de baryum dont la teneur théorique en baryum est 38,53 p. 100, j'ai trouvé $38,6 \pm 0,2$.

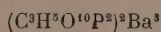
De même une analyse organique élémentaire m'a donné 19,95 p. 100 de carbone au lieu du chiffre théorique 20,2 et 3,17 d'hydrogène au lieu de 3,11; la petitesse de la prise d'essai permet des erreurs expérimentales de cet ordre.

Une partie de l'acide phosphorique est donc liée à de l'acide glycérique formant un composé très stable, assez résistant à l'hydrolyse acide.

Comme il est dit ci-dessus, l'acide glycérique fut obtenu par hydrolyse sulfurique prolongée d'un précipité barytique; pour savoir combien de molécules d'acide phosphorique sont liées à l'acide glycérique, ce premier précipité barytique fut analysé après purification par plusieurs précipitations par l'alcool à partir de sa solution dans l'acide chlorhydrique très dilué, puis à partir de sa solution aqueuse. Le rapport du phosphore au baryum fut 0,297, ce qui correspond à très peu près à trois atomes de baryum pour quatre de phosphore, car dans ce cas le rapport calculé serait 0,301. L'analyse a, d'autre part, donné 12,8 p. 100 de phosphore dans ce précipité, ce qui ne peut pas s'expliquer par la présence d'une seule molécule d'acide phosphorique liée à l'acide glycérique, la formule ci-dessous semble donc valable pour le composé phosphoré de l'acide glycérique.



Le composé barytique analysé ci-dessus est précipitable de sa solution par la baryte en donnant un composé plus riche en baryum, le composé étudié n'était donc pas saturé en baryum et, comme il contenait trois atomes de baryum pour quatre de phosphore, il faut lui appliquer la formule suivante :



diphosphoglycérate tribarytique.

En opérant, aussi quantitativement qu'il est possible, l'extraction de l'acide glycérique, on constate que la quantité d'acide glycérique obtenue ne suffit pas à expliquer la forte teneur du filtrat trichloracétique en acide phosphorique libérable par hydrolyse. Il faut donc supposer un rendement très mauvais de la méthode de séparation de l'acide glycérique ou la présence d'un autre composé hydrolysable phosphoré; cette question est l'objet d'un travail en cours.

D'où provient cet acide phosphoglycérique? le fait suivant, facile à mettre en évidence, fait penser à une influence de l'alimentation : on trouve des quantités différentes de phosphore libérable par hydrolyse chez le même animal avant et après un repas. Des expériences en cours ont pour but de voir si l'alimentation hydrocarbonée et le travail musculaire influent, d'autres expériences portent sur les variations pathologiques. Une étude particulièrement intéressante est celle des teneurs en acide phosphorique libérable par hydrolyse des sérums de diabétiques, avant et après le repas, avant et après injections d'insuline. Quelques résultats intéressants ont déjà été obtenus, mais ils sont encore en nombre beaucoup trop restreint pour permettre une conclusion certaine et feront, je l'espère, l'objet d'une publication ultérieure.

Je tiens à remercier M^{lle} Geneviève Zwilling pour l'aide précieuse qu'elle a bien voulu me donner au cours de ce travail en effectuant une grande partie des nombreux microdosages de phosphore.

Le Gérant : G. MASSON.